

Aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
Direktor: Prof. Dr. med. R. F. Maier

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg

Proliferation und Apoptose in Abhängigkeit der N-Myc-Amplifikation im humanen Neuroblastom und ihre prognostische Bedeutung

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg



vorgelegt von Julian Dahms
aus Alfeld
Marburg 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 11. Dezember 2008.

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan:	Professor Dr. med. Matthias Rothmund
Referent:	Professor Dr. med. Holger Christiansen
1. Korreferent:	PD Dr. med. Andreas Burchert

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	4
1. Einleitung.....	6
1.1. Das Neuroblastom.....	6
1.1.1. Epidemiologie.....	6
1.1.2. Ätiologie und Pathogenese.....	6
1.1.3. Klinik.....	7
1.1.4. Metastasierung und Staging.....	7
1.1.5. Histopathologie.....	8
1.1.6. Molekulare Mechanismen	9
1.1.6.1. Neurotrophine und Neurotrophinrezeptoren.....	9
1.1.6.2. Chemoresistenz.....	10
1.1.6.3. Telomerase.....	10
1.1.7. Genetik.....	11
1.1.7.1. Prädisposition.....	11
1.1.7.2. N-Myc-Amplifikation.....	11
1.1.7.3. 1p36 LOH.....	12
1.1.8. Diagnostik.....	12
1.1.9. Therapie.....	13
1.1.10. Prognose.....	14
1.2. Proliferation und Apoptose.....	14
1.2.1. Der Zellzyklus.....	15
1.2.1.1. Cykline.....	16
1.2.1.2. Cyklin-abhängige Kinasen (CDK).....	17
1.2.1.3. CDK-Inhibitoren (CKI).....	17
1.2.1.4. Restriktionspunkte.....	18
1.2.1.4.1. p53.....	18
1.2.1.4.2. pRb/E2F.....	19
1.2.2. Apoptose.....	20
1.2.2.1. Intrazelluläre Apoptoseinduktion und –durchführung.....	21
1.2.2.2. Das TNF- und CD95/Fas/APO-1- Rezeptor System.....	22
1.3. Das Myc-Gen.....	22
1.3.1. Myc-Struktur und funktionelle Domänen.....	23
1.3.2. Funktionsweise von Myc.....	24
1.3.2.1. Myc als Antagonist von Mnt.....	25
1.3.2.2. Die E-Box.....	26
1.3.2.3. TRRAP.....	26
1.4. Fragestellung.....	27
2. Material und Methoden.....	28
2.1. Tumormaterial.....	28
2.2. Cyklin A-Western Blot.....	28
2.2.1. Material.....	28
2.2.1.1. Herstellung von Proteinlysaten aus primären Tumoren.....	28
2.2.1.2. Proteinbestimmung nach Bradford.....	29
2.2.1.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	29
2.2.1.4. Western Blot.....	29
2.2.2. Methode.....	31
2.2.2.1. Herstellung von Proteinlysaten aus primärem Tumorgewebe.....	31
2.2.2.2. Proteinbestimmung nach Bradford.....	31
2.2.2.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page).....	32

2.2.2.4. Western Blot.....	33
2.2.2.5. Bewertung des Western Blot.....	34
2.3. TUNEL – TdT-mediated dUTP-biotin nick end labelling.....	34
2.3.1. Material.....	34
2.3.1.1. Vorbereitung der Objektträger.....	34
2.3.1.2. Kryoschnitte.....	34
2.3.1.3. TUNEL-Färbung.....	34
2.3.1.4. DAPI-Färbung.....	35
2.3.1.5. Sonstiges.....	35
2.3.1.6. Auswertung der Schnitte.....	35
2.3.2. Methode.....	35
2.3.2.1. Anfertigung der Kryoschnitte.....	35
2.3.2.2. Färbung.....	36
2.3.2.3. Auswertung.....	37
2.4. Statistik.....	38
3. Ergebnis.....	39
3.1. Struktur der untersuchten Gruppe.....	39
3.2. Amplifikation des N-Myc-Gens.....	39
3.3. Proliferation.....	41
3.4. Apoptose.....	46
4. Diskussion.....	51
4.1. N-Myc und Proliferation.....	51
4.2. N-Myc und Apoptose.....	53
4.3. Modell zum prognostischen Einfluss von Proliferation und Apoptose.....	55
5. Zusammenfassung.....	59
6. Literaturverzeichnis.....	61
7. Anhang.....	78
Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen.....	78
Verzeichnis der akademischen Lehrer.....	79
Danksagung.....	80

1. Einleitung

1.1. Das Neuroblastom

Beim Neuroblastom handelt es sich um einen Tumor sympathischer Vorläuferzellen, der sich im Nebennierenmark oder paravertebral manifestieren kann (Koletzko – Kinderheilkunde und Jugendmedizin, 12. Auflage, Kap. 11.9, Springer). Das wohl bemerkenswerteste Charakteristikum des Neuroblastoms besteht in seinen diametralen Verlaufsformen: während die meisten Patienten, insbesondere im Säuglingsalter, bei minimaler Therapie oder gar lediglich abwartender Beobachtung eine komplette Regression oder Ausreifung ihres Tumors in ein benignes Ganglioneurom erleben, versterben gerade die älteren Patienten (> 1 Jahr) häufig trotz maximaler multimodaler Therapie an den Folgen ihrer rasch metastasierenden Erkrankung (Maris & Matthay, 1999). Als hochsignifikantes, in seiner Wirkungsweise jedoch noch weitestgehend unverstandenes Prognosekriterium für die klinische Entwicklung hat sich der Amplifikationsstatus des N-Myc-Genes etabliert. Die klare Dichotomie findet sich in keinem anderen Tumorsystem und macht das Neuroblastom daher so faszinierend und interessant für die biomedizinische Forschung.

1.1.1. Epidemiologie

Das Neuroblastom ist der häufigste solide extrakranielle Tumor im Kindesalter und mit ca. 8% die dritthäufigste pädiatrische Malignomerkrankung nach den Lymphomen/Leukämien und den Hirntumoren (Koletzko – Kinderheilkunde und Jugendmedizin, 12. Auflage, Kap. 11, Springer). Nach Altersstandardisierung betrug die Inzidenz des Neuroblastoms in Deutschland, basierend auf Ergebnissen aus den Jahren 1997 bis 2006, 1,3 Fälle pro 100.000 Kinder unter 15 Jahren pro Jahr (Kaatsch et al., 2007). Eine geschlechtliche Disposition kann bei einem Geschlechterverhältnis von Jungen zu Mädchen von 1,2 nicht festgestellt werden (Kaatsch et al., 2007). Das mediane Alter bei Diagnosestellung liegt in Deutschland bei 15 Monaten (Kaatsch et al., 2007), weltweit bei ca. 18 Monaten (Brodeur, 2003). Die 5-Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit liegt in Deutschland bei 78%, die 10-Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit bei 75% (Kaatsch et al., 2007).

1.1.2. Ätiologie und Pathogenese

Die Ätiologie des Tumors ist unbekannt. Auslöser konnten bisher nicht identifiziert werden, und es gibt wenig Anhalt für Umwelt- oder Risikofaktoren (Brodeur, 2003).

Das Neuroblastom ist ein embryonaler Tumor, der sich während der Embryonal- und Fetalperiode aus sympathoadrenergen Vorläuferzellen der Neuralleiste, den Neuroblasten, entwickelt. Normalerweise wandern die Neuroblasten aus, differenzieren sich und bilden die sympathischen paravertebralen Ganglien und das Nebennierenmark. Unterbleibt aus unbekannten Gründen die Differenzierung oder werden die Zellen entdifferenziert, kommt es an diesen Organen zur Entstehung eines Neuroblastoms (Böcker/Denk/Heitz – Pathologie, 3. Aufl, Kap. 40.7.1, Urban&Fischer).

1.1.3. Klinik

Klinisch bieten Neuroblastompatienten ein sehr variables Bild, das entscheidend von der Lokalisation des Primarius geprägt wird. Es kommen ungefähr 70% der Primärtumoren abdominell, 25% thorakal und 5% pelvin zu liegen. Bei abdomineller Lokalisation können sich die Tumoren als Vorwölbung präsentieren, mediastinale oder zervikale Tumoren können mit Schwellung und/oder Horner-Syndrom einhergehen. Tumoren der paravertebralen Ganglien können durch die Foramina intervertebralia in den Spinalkanal einwachsen („Sanduhr-Tumoren“) und so durch Kompression des Rückenmarks Parästhesien, Paraplegie und Blasen- und Mastdarmlähmung hervorrufen. Häufig finden sich auch (retro-) orbitale Metastasen, die mit typischen periorbitalen Ekchymosen und Protrusio bulbi einhergehen. Weiterhin präsentieren sich die Kinder mit Irritabilität, durch Knochenschmerz bedingtem Hinken und gelegentlich mit Fieber. Säuglinge im Stadium 4S (s.u.) fallen meist durch eine ausgeprägte Hepatomegalie bei Lebermetastasen auf. Selten und überwiegend in niedrigen Krankheitsstadien tritt ein paraneoplastisches Opsoclonus/Myoclonus-Syndrom mit Myoklonien, raschen Augenbewegungen und zerebellärer Ataxie auf. Häufig handelt es sich aber auch um Zufallsbefunde beispielsweise im Rahmen thorakaler Röntgenuntersuchungen aus anderer Indikation (Koletzko – Kinderheilkunde und Jugendmedizin, 12. Auflage, Kap. 11.9, Springer).

1.1.4. Metastasierung und Staging

Das Neuroblastom metastasiert lymphogen und hämatogen. Hämatogene Metastasen finden sich vor allem in Knochenmark, Knochen, Leber und Haut, selten in Lunge oder Gehirn. Unter Berücksichtigung der Ausdehnung des Primarius und des Grades der Metastasierung wird das Neuroblastom gemäß dem „International Neuroblastoma Staging System“ (Brodeur et al., 1993) in die Stadien 1, 2, 3, 4 und 4S unterteilt, wobei

das Stadium 4S, das nur bei Säuglingen auftritt, eine Sonderstellung einnimmt. Dabei finden sich zwar wie auch in Stadium 4 Metastasen, allerdings beschränken sich diese bei nur sehr geringer Knochenmarksinfiltration auf Leber und Haut. Weiterhin haben diese Patienten eine weitaus bessere Prognose als Stadium-4-Patienten.

Stadium 1	Lokalisierter, makroskopisch komplett resezierbarer Tumor; repräsentativer ipsilateraler Lymphknoten histologisch tumorfrei (mitresezierte Lymphknoten dürfen Tumor-positiv sein)
Stadium 2a	Lokalisierter, inkomplett resezierbarer Tumor; repräsentative ipsilaterale nichtadhärente Lymphknoten histologisch tumorfrei
Stadium 2b	Lokalisierter Tumor; Tumorbefall eines ipsilateralen nichtadhärenten Lymphknotens, kontralaterale Lymphknoten histologisch tumorfrei
Stadium 3	Nicht-resektabler unilateraler Tumor, der die Wirbelsäule überschreitet, mit oder ohne regionaler Lymphknotenbeteiligung Oder lokalisierter unilateraler Tumor mit kontralateraler Lymphknotenbeteiligung Oder Mittellinientumor mit bilateraler infiltrativer Ausdehnung oder Lymphknotenbeteiligung
Stadium 4	Disseminierte Tumorerkrankung mit Befall von Knochenmark, Knochen, entfernten Lymphknoten, Haut, Leber und/oder anderen Organen
Stadium 4S	Lokalisierter Primärtumor wie in Stadium I oder II beschrieben mit Dissemination begrenzt auf Leber, Haut und Knochenmark (nur Kinder < 12 Monaten; nur geringe Knochenmarksinfiltration (<10% Tumorzellen im Ausstrich, MIBG-Szintigrafie für Knochenmark negativ))

Tab. 1: Klinische Stadieneinteilung des Neuroblastoms

1.1.5. Histopathologie

Neuroblastome sind meist lobulierte graurote, weiche Tumoren, die häufig größere Blutungen, fleckförmige Nekrosen und Verkalkungen aufweisen. Die Kern-Plasma-Relation ist zugunsten des Kerns verschoben, die Kerne sind hyperchromatisch. Eine beginnende Differenzierung zeigt sich in der Ausbildung sogenannter Pseudorosetten, der Bildung einer feinfibrillären Matrix und einzelner reifer Ganglienzellen. Kommt es zu einer stärkeren Ausreifung mit vielen Ganglienzellen, handelt es sich um ein sog. Ganglioneuroblastom. Besteht der Tumor ausschließlich aus reifen Strukturen (Ganglienzellen, Schwann-Zellen und Neurofibrillen) wird er Ganglioneurom genannt. Letzteres gilt als potentiell benignes Endstadium der Erkrankung (Böcker/Denk/Heitz – Pathologie, 3. Aufl, Kap. 40.7.1, Urban&Fischer). Auf der Basis der histopathologischen Klassifikation von Shimada (Shimada et al., 1984) gibt es mittlerweile die „International Neuroblastoma Pathology Classification“ (INPC). Diese

zieht zum histologischen Grading von Neuroblastomen die Menge an Schwann-Zellen, mitotische Figuren und den Grad der Kerndegeneration heran (Shimada et al. 1999).

1.1.6. Molekulare Mechanismen

1.1.6.1. Neurotrophine und Neurotrophinrezeptoren

Wahrscheinlich sind in die Entstehung und maligne Transformation sympathischer Neuroblasten in Neuroblastomzellen neurotrophe Faktoren und ihre zugehörigen Tyrosinkinase-Rezeptoren eingebunden. Diese werden als TrkA, TrkB und TrkC bezeichnet. Ihre hauptsächlichen Liganden sind der „nerve growth factor“ (NGF), der „brain-derived neurotrophic factor“ (BDNF), Neurotrophin 3 (NT3) und, nur über TrkB, Neurotrophin 4 (NT4, auch NT5 genannt) (Yano & Chao 2000; Patapoutian & Reichardt, 2001).

TrkA ist ein transmembranöser, wahrscheinlich als Homodimer fungierender Tyrosinkinase-Rezeptor, der auch als „high affinity nerve growth factor receptor“ bezeichnet wird. Bei Bindung eines NGF-Homodimers, wie es unter anderem von den die Neuroblastomzellen umgebenden Schwann-Zellen produziert wird (Ambros et al., 1996), kommt es auf Seite des Zytosols zu einer Autophosphorylierung des Rezeptors und in der Folge per Signaltransduktion über verschiedene Kaskaden (Ras, PI3K,...) zur Transkriptionsinduktion. Letztlich hat sich gezeigt, dass hohe Aktivität dieser Signalkaskaden zu Differenzierung oder Überleben der Zelle führt, während eine Unterbindung der TrkA-Aktivierung Apoptose verursacht (Brodeur, 2003; Nakagawara & Brodeur, 1997). Hohe TrkA-Expressionslevel gehen meist mit jungem Patientenalter, niedrigem Krankheitsstadium und ohne N-Myc-Amplifikation einher (Nakagawara et al., 1993). Der TrkA/NGF-Mechanismus könnte also eine entscheidende Rolle für die Fähigkeit zum Überleben und zur Ausdifferenzierung von Neuroblastomzellen zu reifen Ganglienzellen spielen und als gut-prognostischer Marker dienen.

Sowohl TrkB als auch TrkC können trunkiert, also ohne die Tyrosinkinase, oder vollständig exprimiert werden. Die Expression des vollständigen TrkB ist stark mit N-Myc-Amplifikation assoziiert (Nakagawara et al., 1994) und geht mit einer schlechten Prognose einher. Sie fördert die Überlebensfähigkeit der Zellen, verstärkt die Angiogenese sowie die Resistenz gegenüber Chemotherapeutika (Acheson et al., 1995; Matsumoto et al., 1995). Des Weiteren findet sich in solchen Tumorzellen auch die Expression des zugehörigen TrkB-Liganden BDNF, was einen autokrinen oder aber parakrinen Mechanismus nahelegt und den beobachtbaren Überlebens- und

Wachstumsvorteil erklären könnte (Acheson et al., 1995; Matsumoto et al., 1995). Ausreifende Tumoren zeigen dagegen eher Expression der trunkierten TrkB-Variante, wohingegen die unreifsten, nicht amplifizierten gar kein TrkB exprimierten (Eggert et al., 2000; Ho et al., 2002).

TrkC findet sich ähnlich wie TrkA vorwiegend in niedrigen Tumorstadien und ist insbesondere bei nicht amplifizierten Tumoren hochexprimiert (Yamashiro et al., 1996). Ein weiterer transmembranöser, allerdings nur niedrig-affiner Rezeptor für alle Mitglieder der NGF-Familie, ist p75NGFR. Er wird auch als „low affinity nerve growth factor receptor“ bezeichnet und ist Mitglied der „*tumor necrosis factor receptor death-receptor*“-Familie. Er weist keine Kinaseaktivität auf. Aktivierung von p75 kann zu Apoptose oder Differenzierung führen, allerdings nur bei Koexpression von Trk-Rezeptoren (Casaccia-Bonofil et al., 1999; Hempstead, 2002). Werden TrkA und p75NGFR koexprimiert, so ist dies mit einer guten Prognose assoziiert (Kogner et al., 1993).

1.1.6.2. Chemoresistenz

Erworbene und primäre Resistenz gegenüber Zytostatika ist ein Hauptproblem in der Therapie des Neuroblastoms. In Tumorzelllinien, die aus Tumoren von Rezidivpatienten generiert wurden, zeigte sich eine signifikant höhere Resistenz gegenüber Standardchemotherapeutika als in Kontrollzelllinien (Kuroda et al., 1991; Keshelava et al., 1997). Mechanistische Grundlage der Chemoresistenz ist vermutlich ein verstärkter Medikamenten-Efflux, der durch die Überexpression des für die ATP-abhängige sog. „*efflux pump*“ kodierenden Genes P-GY-1 zustande kommt (Bradshaw & Arceci, 1998). Nach zytostatischer Behandlung konnte in primären Neuroblastomen eine Überexpression von P-GY-1 nachgewiesen werden (Bourhis et al., 1989). Ein weiterer Mechanismus liegt wohl in der Überexpression des „multidrug resistance gene 1“ (MDR1), das für das „multidrug resistance-related protein“ (MRP) kodiert (Goldstein et al., 1990; Chan et al., 1991). Dafür konnte eine N-Myc-abhängige Expression sowie eine Korrelation mit dem Überleben der Patienten gezeigt werden (Norris et al., 1996).

1.1.6.3. Telomerase

Wie in vielen anderen Tumorsystemen zeigt auch das Neuroblastom bei hohem Malignitätsgrad bzw. Krankheitsstadium eine hohe Telomerase-Aktivität (Hiyama et al.,

1995). Diese reverse Transkriptase erhält wider die physiologische Verkürzung der Telomere bei jeder Zellteilung deren Länge aufrecht und trägt damit ganz entscheidend zur Immortalisierung einer Zelle bei.

1.1.7. Genetik

1.1.7.1. Prädisposition

Bei ca. 22% der Neuroblastompatienten liegt eine familiäre Disposition infolge Keimbahnmutation zur Manifestation des Neuroblastoms vor, die einem autosomal-dominanten Erbgang folgt (Knudson & Strong, 1972). Das mediane Alter bei Diagnosestellung der Patienten mit familiärem Neuroblastom liegt bei 9 Monaten, während das der Gesamtpopulation weltweit bei ca. 18 Monaten liegt. Mindestens 20% der Patienten mit familiärem Neuroblastom haben bilaterale adrenale oder multifokale Tumoren (Maris & Matthay, 1999). Die konkordante Krankheitsentwicklung bei Zwillingen im Säuglingsalter legt nahe, dass hier noch hereditäre Faktoren entscheidend sind, während die Diskordanz bei älteren Zwillingen für zufällige Mutationen oder andere Faktoren spricht (Kushner & Helson, 1985). Der für die genetische Disposition verantwortliche Genlocus ist wahrscheinlich 16q12-13 (Maris et al., 2002). Dabei bleibt es aber unklar, ob dieser der einzige ist, oder ob auch Mutationen an anderen Loci eine genetische Disposition zur Manifestation eines Neuroblastoms bewirken können.

1.1.7.2. N-Myc-Amplifikation

Viele Neuroblastome zeigen in der Immunfluoreszenz zytogenetische Manifestationen von Genamplifikation in Form von „*double-minute chromatin bodies*“ oder „*homogeneously staining regions*“. Schwab et al. wiesen 1983 das bis dahin unbekannte Onkogen N-Myc als das in Neuroblastomzelllinien regelmäßig amplifizierte Gen nach (Schwab et al., 1983). Auch in primären Neuroblastomen fand sich das auf Chromosom 2p24 lokalisierte N-Myc-Gen häufig amplifiziert (Brodeur et al., 1984). Heute gilt die Amplifikation von N-Myc unzweifelhaft als wichtigstes molekulares Prognosekriterium. Sowohl in fortgeschrittenen Krankheitsstadien, in denen N-Myc hauptsächlich amplifiziert vorliegt, als auch bei Säuglingen und niedrigem Stadium ist die Amplifikation von N-Myc mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Seeger et al., 1985). Die Gesamtprävalenz der N-Myc-Amplifikation in Neuroblastomen liegt bei ungefähr 22% (Brodeur et al., 1997). Es ist dabei zu vermuten, dass sie eine konstituierende stabile Eigenschaft einer Untergruppe besonders aggressiv wachsender

Neuroblastome ist und sich nicht erst mit dem Fortschreiten der Erkrankung entwickelt (Brodeur et al., 1987). Wie genau die N-Myc-Amplifikation zu einem wesentlich aggressiveren Wachstumsverhalten beiträgt, ist noch nicht vollständig geklärt.

1.1.7.3. 1p36 LOH

Eine Deletion des kurzen Armes von Chromosom 1 kommt in ca. 35% aller Neuroblastome vor (White et al., 2001). Sie korreliert stark mit fortgeschrittenem Krankheitsstadium, schlechter Prognose und N-Myc-Amplifikation (Fong et al., 1989). Dafür verantwortlich ist wahrscheinlich ein allelischer Verlust des Gens oder der Gene in Höhe 1p36, also ein „loss of heterozygosity“ (LOH). Es wurden aber mindestens 2 weitere Regionen auf 1p detektiert, die für die phänotypischen Veränderungen verantwortlich sein könnten. Neben der N-Myc-Amplifikation ist der 1p36 LOH wichtigstes molekulares Prognosekriterium.

1.1.8. Diagnostik

Das Neuroblastom ist ein Katecholamine produzierender Tumor. Ca. 90-95% der Patienten eliminieren die entsprechenden Abbauprodukte renal, so dass sich Vanillinmandelsäure und Homovanillinsäure als die gebräuchlichsten Metabolite in Serum und Urin zur Diagnostik und Verlaufskontrolle nachweisen lassen. (Koletzko – Kinderheilkunde und Jugendmedizin, 12. Auflage, Kap. 11.9, Springer). Als weiterer Verlaufssparameter wird das Serumferritin genutzt, welches in fortgeschrittenen Tumorstadien erhöht ist (Hann et al., 1985). Gleiches gilt für die Neuronen-spezifische Enolase (Zeltzer et al., 1986). Das Disialogangliosid G_{D2} findet sich auf der Oberfläche der meisten Neuroblastome. Diese abzuwerfen könnte für die Tumورprogression eine Rolle spielen (Ladisch & Wu, 1985), so dass sich erhöhte G_{D2} -Plasmalevel bei Neuroblastompatienten finden lassen. Obgleich Neuroblastom-unspezifisch, wird auch die Serum-Lactatdehydrogenase (LDH) als genereller Marker des Zellumsatzes für die Verlaufskontrolle genutzt. Eine hohe LDH spricht für eine hohe Tumorlast (Shuster et al., 1992). Im Rahmen des Stagings finden als bildgeberische Verfahren Ultraschall, Röntgen, MRT, ^{123}I -MIBG-Szintigraphie inkl. SPECT, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Szintigraphie und ^{111}In -Octreotid-Szintigraphie Anwendung. Wegen der häufigen Knochenmarksbeteiligung bei fokalem Neuroblastom werden zudem Knochenmarksaspirate von mindestens 4 verschiedenen Punktionsstellen für eine adäquate Diagnostik gefordert. Als wichtigste diagnostische Maßnahme gilt, wie aus der oben ausführlich dargelegten Tumorbilogie

klar wird, zweifelsohne die Tumorbiopsie mit nachfolgender histologischer und molekulargenetischer Untersuchung („NB2004 Trial Protocol for Risk Adapted Treatment of Children with Neuroblastoma“, der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie; fortan NB2004).

1.1.9. Therapie

Auf der Basis obiger Erkenntnisse lässt sich das Patientenkollektiv in verschiedene Risikogruppen einteilen. Die NB2004 berücksichtigt dabei das Krankheitsstadium, das Patientenalter, die N-Myc-Amplifikation und die 1p-Deletion und schlägt eine Einteilung in drei Risikogruppen vor. Die Therapie der Patienten erfolgt entsprechend risikoadaptiert.

Bei niedrigem Risiko ist eine initiale komplette Resektion des Tumors nur indiziert, wenn die operationsassoziierten Komplikationen als gering einzuschätzen sind. Andernfalls wird eine inkomplette Resektion oder lediglich eine Biopsie durchgeführt. Danach wird der Patient zunächst nur beobachtet, es sei denn, es bestehen oder drohen tumorbedingte Symptome, ein Progress oder ein Rückfall des Tumors. In diesem Fall erhalten die Patienten maximal 4 Chemotherapie-Zyklen mit Doxorubicin, Vincristin, Cyclophosphamid und MESNA. Bleibt auch diese Chemotherapie erfolglos, werden die Patienten fortan in die Gruppe mittleren Risikos eingestuft.

Bei mittlerem Risiko folgen der initialen Biopsie oder Resektion als Induktionstherapie im Wechsel je 3 Zyklen mit Cisplatin, Etoposid und Vindesin bzw. mit Vincristin, Dacarbacin, Ifosfamid und Doxorubicin. Nach diesen 6 Zyklen wird bei adäquater Tumorgroße und annehmbarem operativem Risiko eine „second look“-Resektion durchgeführt. Verbleibendes Tumorgewebe wird von extern bestrahlt, während noch eine orale Erhaltungstherapie mit 4 Zyklen niedrig dosiertem Cyclophosphamid erfolgt. Schließlich werden noch 9 14-tägige Zyklen Retinolsäure über 12 Monate hinweg verabreicht. Retinsäure-Derivate induzieren Differenzierung und verlangsamen das Wachstum von Neuroblastomzellen in Kultur (Sidell et al., 1983).

Bei hohem Risiko wird die initiale Resektion oder Biopsie gefolgt von entweder der Standardinduktionstherapie, wie sie auch bei mittlerem Risiko gegeben wird, oder aber auf experimenteller Basis von zunächst 2 Zyklen Topotecan, Cyclophosphamid und Etoposid, bevor auch hier die Standardtherapie einsetzt. Auch bei hohem Risiko wird nach der Induktion eine „second look“-Operation angestrebt. Anschließend wird in dieser Gruppe eine knochenmarksablative autologe Stammzelltransplantation, die

sogenannte „Megatherapie“, durchgeführt in Kombination mit ^{131}J -MIBG-Brachytherapie. Bestehen auch dann noch aktive Tumorresiduen, werden diese nach der Megatherapie zusätzlich von extern bestrahlt. Weiterhin erhalten auch alle Hochrisikopatienten für 12 Monate Retinolsäure (NB2004).

1.1.10. Prognose

Das wichtigste für die Prognose entscheidende Kriterium des Neuroblastoms ist das Alter des Patienten bei Diagnosestellung. Säuglinge (85% Überlebenswahrscheinlichkeit), also Patienten unter 1 Jahr, haben eine substantiell bessere Prognose als ältere Kinder (40% Überlebenswahrscheinlichkeit), auch bei gleichem Krankheitsstadium (Koletzko – Kinderheilkunde und Jugendmedizin, 12. Auflage, Kap. 11.9, Springer). Weiterhin ist die N-Myc-Amplifikation entscheidendes Prognostikum. Patienten aller Altersgruppen mit nicht metastasiertem Neuroblastom (Stadium 1-3) zeigen bei Abwesenheit von N-Myc-Amplifikation eine ereignisfreie 5-Jahresüberlebensrate von 84%, bei N-Myc-Amplifikation von nur 42%. (Koletzko – Kinderheilkunde und Jugendmedizin, 12. Auflage, Kap. 11.9, Springer). Weiteres prognostisches Kriterium ist das INSS-Stadium. Das 2-Jahres-krankheitsfreie Überleben beträgt in den Stadien 1, 2 und 4S 80-90%, in den Stadien 3 und 4 dagegen nur 40-50%. Auch die Lokalisation des Primärtumors hat Einfluss auf die Prognose. Patienten mit dem Primarius in der Nebenniere haben eine schlechtere Prognose als andere (Brodeur, 2003).

1.2. Proliferation und Apoptose

Tumoren entstehen, wenn Zellen immerfort unkontrolliert proliferieren. Eine kontrollierte Proliferation dagegen ist essentiell für beispielsweise das Wachstum, die Wundheilung, die Blutbildung oder etwa die permanente Regeneration des Darmepithels. Grundlage der Proliferation jedes Gewebes ist der 1951 von Howard und Pele erstmalig beschriebene Zellzyklus (Golias et al., 2004). Ist dieser in irgendeiner Art gestört, kann es zu unkoordinierter und unkontrollierter Proliferation der betroffenen Zelle und damit zur Tumorigenese kommen.

Analog dazu ist auch eine kontrollierte und im Gewebe koordinierte Apoptose, also des der Proliferation entgegengesetzten programmierten Zelltodes, für ein geregeltes Wachstum, die klonale Selektion im Rahmen der Immunabwehr, die Involution von Organen und vielleicht sogar als körpereigener Abwehrmechanismus gegen

Tumorstadium von grundlegender Bedeutung. Abgesehen von einigen anderen extrazellulären auch intrazellulären Mechanismen kann es auch im Rahmen des Zellzyklus bei entsprechender Signalgebung statt zur Proliferation zur Apoptose kommen. Tatsächlich zeigen die meisten, wenn nicht gar alle, menschlichen Tumoren eine deregulierte Kontrolle der G1-Phase des Zellzyklus (Malumbres & Carnero, 2003). Es ist weiterhin bekannt, dass die genetischen Veränderungen, die zur Entstehung von Neoplasien führen, neben denen der Apoptose und denen der Differenzierung vor allem die zellzyklusregulierenden Gene betrifft. Onkogene, die den Zellzyklus fördern und enthemmen, werden aktiviert, Tumorsuppressorgene, die den Zellzyklus inhibieren, werden dagegen inaktiviert (Corn & El-Deiry, 2002; McDonald & El-Deiry, 2001).

1.2.1. Der Zellzyklus

Der Zellzyklus ist ein hoch konservierter und geordneter Ablauf von unterschiedlichen Phasen, die über Zellwachstum, chromosomale Duplikation und Segregation schließlich zur Teilung in 2 Tochterzellen führt. Er unterteilt sich in Interphase und Mitose (M-Phase). Die Interphase teilt sich weiter auf in die G1-Phase, die S-Phase und die G2-Phase (Golias et al., 2004). Daneben gibt es noch die G0-Phase, die dem proliferatorischen Ruhezustand der Zelle entspricht. Unter Einwirkung mitogener Stimuli ist von hier aus jederzeit ein Eintritt in die G1-Phase und damit in den Beginn der Proliferation möglich. Hauptaufgabe der G1-Phase ist es, die Voraussetzungen für die in der nachfolgenden S-Phase stattfindende DNA-Duplikation zu schaffen. Ob diese Voraussetzungen erfüllt sind und ein Voranschreiten des Zyklus möglich ist, wird an sogenannten Restriktionspunkten entschieden. In der zeitlichen Mitte der G1-Phase lässt sich der erste Restriktionspunkt analog zu dem in Hefe beschriebenen START definieren (Pardee, 1974; Hartwell et al., 1973). Hier wird entschieden, ob überhaupt eine Zellteilung stattfindet. Vor dem Übergang zur S-Phase werden weitere Kontrollpunkte (p53, pRb; s.u.) durchlaufen. Nach der S-Phase folgt die G2-Phase, in der wiederum Kontrollpunkte durchlaufen werden müssen, wobei nach der Replikation der DNA vor der Mitose noch einmal die Integrität des Genoms und der Zelle überprüft werden. Erst nach diesen Kontrollmechanismen kann die Zelle in die Mitose eintreten. In seinem gesamten Ablauf wird er engmaschig kontrolliert und reguliert von unterschiedlichen Mechanismen, die sein Voranschreiten entweder zulassen, verzögern oder gar den vollständigen Abbruch bis hin zur Apoptose einleiten. Die dazu wesentlichen Proteinfamilien sind die Cykline, die Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK),

die CDK-Inhibitoren (CKI) und schließlich die Tumorsuppressorgen-Produkte p53 und pRb (Gali-Muhtasib & Bakkar, 2002). Des Weiteren wird der Zyklus von extrazellulären Signalen (Wachstumsfaktoren etc.) gesteuert (Baserga et al., 1993).

Welcher Weg letztlich allerdings eingeschlagen wird, hängt von diversen Variablen, wie Zelltyp, zellulärer Umgebung und genetischer Ausstattung ab. Für c-Myc, p53, pRb, Ras, PKA, PKC, Bcl-2, NFκB sowie für verschiedene CDK, Cykline und CKI konnte gezeigt werden, dass sie je nach Umgebungsbedingung sowohl Proliferation, Zyklusarrest und Apoptose begünstigen können (vgl. Vermeulen et al., 2003).

1.2.1.1 Cykline

Die Familie der Cykline ist zentraler Bestandteil der Zellzyklusregulation. Als strukturelles Merkmal weisen sie alle sog. „cyclin box“-Regionen auf (Joyce et al., 2001). Die ca. 56 kDa großen Proteine sind in die mitotischen Vorgänge aller Eukaryonten involviert. Sie fungieren als regulatorische Untereinheiten im Komplex mit den Cyklin-abhängigen Kinasen und steuern damit den Zellzyklusprogress über die einzelnen Phasen und Restriktionspunkte indirekt per Phosphorylierung. Die verschiedenen Cykline werden im Laufe des Zellzyklus sequentiell unterschiedlich exprimiert (Golias et al., 2004).

Die Expression der Cykline D-, E- und A unterliegt der Kontrolle durch die für die Initialisierung der S-Phase notwendigen E2F-Transkriptionsfaktoren (Sala et al., 1994; Ohtani et al., 1995; Botz et al., 1996; Schulze et al., 1995). Die D-Typ Cykline unterliegen weiterhin der transkriptionellen Kontrolle durch Ras und c-Myc (Winston & Pledger 1993; Roussel et al. 1995, Bouchard et al. 1999). Im Verlauf der G1-Phase werden die D-Typ-Cykline -1,-2, und - 3, die mit CDK4 und CDK6 assoziiert vorliegen, sowie Cyklin E assoziiert mit CDK2 hochexprimiert. Direkt am Übergang zur S-Phase wird Cyklin A hochexprimiert (Sherr, 1993). Cyklin E ist zeitlich nach Cyklin D aktiv (Dulic et al. 1992; Koff et al. 1992). Höchste Expressionslevel für Cyklin E finden sich am G1-S-Übergang. Eine Überexpression von Cyklin D verkürzt die G1-Phase, während mikroinjizierte gegen Cyklin D gerichtete Antikörper einen Zellzyklusarrest in der frühen G1-Phase bewirken (Baldin et al., 1993). Analog hierzu führt eine Überexpression von Cyklin E ebenso zu einer Verkürzung der G1-Phase (Ohtsubo et al., 1995). Cyklin A ist von besonderem Interesse, da es zwei verschiedene CDK aktivieren kann und sowohl in der S-Phase als auch in der Mitose eine Rolle spielt. In der S-Phase gilt die Phosphorylierung von Teilen der DNA-Replikationsmaschinerie, wie bspw. CDC6, durch Cyklin A-CDK-Komplexe als wichtig für die Initiation der

DNA-Replikation und deren Einmaligkeit (Yam et al., 2002). Die Bedeutung von Cyklin A in der Mitose ist weiterhin unklar. Wahrscheinlich trägt es zur Kontrolle der Stabilität von Cyklin B bei (Golias et al., 2004).

1.2.1.2. Cyklin-abhängige Kinasen (CDK)

CDK sind spezialisierte Serin-Threonin-Proteinkinasen, die durch Heterodimerisierung mit den Cyklinen aktiviert werden. Volle katalytische Aktivität können die Cyklin-CDK-Komplexe jedoch erst nach Phosphorylierung der CDK-Untereinheit an Threonin 160 durch spezielle *cyclin activating kinases* (CAK) entfalten (Morgan, 1995).

1.2.1.3. CDK-Inhibitoren (CKI)

Neben der Kontrolle durch Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsschritte sowie der transkriptionellen Regulation der Cyklin-Untereinheiten, unterliegt die Aktivität der Cyklin-CDK-Komplexe einer weiteren Gruppe regulatorischer Proteine, den „*cyclin dependent kinase inhibitors*“ (CKI). Diese Proteine binden entweder an die CDK-Untereinheit oder an die kompletten Komplexe und inhibieren die Kinase-Aktivität, wodurch eine Phosphorylierung von pRb verhindert wird (Peter & Herskowitz, 1994; Elledge & Harper, 1994; Sherr & Roberts, 1995). In Säugerzellen sind zwei verschiedene CKI-Familien bekannt, die beide die Zellzyklusprogression in der G1 Phase inhibieren: die KIP/CIP- sowie die INK4- Familie.

Die KIP/CIP Familie besteht aus den strukturell verwandten Proteinen p21Waf-1/Cip1, p27Kip1 und p57Kip2. Diese Proteine wirken inhibitorisch durch Bindung an aktive Cyklin-CDK-Komplexe zum Teil durch Besetzen der ATP-Bindungsstelle (Sherr & Roberts, 1995). Der N-Terminus des ca. 21 kDa großen p21 bindet an Cyklin-CDK-Komplexe und kann hierüber in vitro die Kinase-Aktivität inhibieren (Chen et al., 1995). Weiterhin ist für die C-terminale Domäne von p21 eine direkte Bindung und hierdurch vermittelte Inhibition des „*proliferating cell nuclear antigen*“ (PCNA), eines Kofaktors der DNA-Polymerase- δ beschrieben (Luo et al., 1995). p21 spielt sowohl in dem DNA-Reparaturmechanismus der Zelle als Zielgen von p53 als auch in der terminalen Differenzierung eine wichtige Rolle (El-Deiry et al., 1993; Parker et al., 1995). Es inhibiert den CyklinD-CDK4/6- und den CyklinE-CDK2-Komplex (Fan et al., 2000), die beide für den G1-S-Übergang nötig sind. Auch für den N-Terminus von p27 ist eine inhibitorische Wirkung verschiedener Cyklin-CDK-Komplexe nachgewiesen (Borriello et al., 2007). p27-Proteinlevel sind in ruhenden Zellen hoch

und fallen mitogenabhängig bei Eintritt in den Zellzyklus ab, was mit einer generellen Desensibilisierung gegenüber antiproliferativen Stimuli wie beispielsweise TGF β (*transforming growth factor beta*) einhergeht (Roberts et al., 1994; Polyak et al., 1994).

Zu der INK4-Familie gehören die Proteine p14/p15INK4b, p16INK4a, p18INK4c und p19INK4d. Die INK4-Proteine inhibieren spezifisch die Cyklin D-abhängigen Kinasen CDK-4 und -6 durch Bindung an die CDK-Untereinheit (Serrano et al., 1993; Guan et al., 1994; Hannon & Beach, 1994). So besteht die wesentliche Funktion der INK4 CKI in der Regulation des Phosphorylierungsstatus des Retinoblastom-Proteins. In Rb-gendefizienten Zellen kann eine p16-Überexpression keinen Zellzyklusarrest mehr bewirken (Lukas et al., 1995).

1.2.1.4. Restriktionspunkte

1.2.1.4.1. p53

Das Tumorsuppressorgen p53 und das zugehörige Protein, welches als sequenzspezifischer Transkriptionsfaktor (Farmer et al., 1992) fungiert, stellt den Kern eines solchen Restriktionspunktes sowohl beim G1/S- als auch beim G2/M-Übergang dar. Beim mitotischen Spindelcheckpoint scheint es dagegen keinen Einfluss zu haben (Golias et al., 2004). Mutationen dieses Gens finden sich in mehr als der Hälfte aller menschlichen Tumoren (Lopez-Saez et al., 1998), was seine herausragende Rolle für die Zellzyklusregulation nahelegt. Die N-terminalen Sequenzen des p53-Proteins dienen als Transkriptionsdomäne (Fields & Jang, 1990), während die C-terminalen für die Homodi- und Homotetramerisierung notwendig zu sein scheinen (Stürzbecher et al., 1992). Die Region für sequenzspezifische DNA-Bindung ist in einer Vielzahl von Tumoren mutiert (Yonish-Rouach et al., 1996).

Unter den zahlreichen Genen, deren Transkription p53 aktiviert, finden sich auch viele, die eine Rolle in der Zellzykluskontrolle spielen: WAF1/CIP1/p21 (El-Deiry et al., 1993); Gadd45, ein durch DNA-Schaden induziertes Wachstumsarrestgen; Mdm2, ein negativer Regulator für p53 selbst (Kastan et al., 1992; Golias et al., 2004). Neben seiner Aktivität als Transkriptionsfaktor aktiviert p53 auch transkriptionsunabhängige Apoptosemechanismen (Haupt et al., 1995).

Eine Hauptaufgabe für p53 besteht darin, den Zellzyklus in der G1-Phase anzuhalten, wenn beispielsweise durch genotoxische Substanzen ein DNA-Schaden entstanden ist.

Dabei gilt die Überexpression von p21CIP1 als für den G1-Arrest entscheidend. Verschiedene Stressfaktoren wie UV-Strahlung oder Gamma-Strahlung induzieren einen raschen Anstieg der p53-Spiegel, hauptsächlich über die Stabilisierung des normal sehr kurzlebigen Proteins. Das Protein p19ARF verhindert den Abbau und die Inaktivierung von p53 dadurch, dass es in Stresssituationen an Mdm2 bindet, welches die p53-Aktivität über diverse Mechanismen antagonisieren kann (Jacobs et al., 1999; Weber et al., 1999; Pomerantz et al., 1998). Dadurch kann dieser Schaden erst behoben und die genetische Stabilität bewahrt werden, bevor die DNA repliziert und die Mitose eingeleitet wird. Bei massivem DNA-Schaden kann p53 sogar statt nur den Zyklus anzuhalten die Zelle in die Apoptose führen (Golias et al., 2004). Dazu kann p53 auf zwei Wegen beitragen. Zum einen führt eine erhöhte p53-Konzentration in der Zelle zu einer vermehrten Expression von Bax. Dieses Protein ist ein proapoptotisches Mitglied der bcl-2 Familie, welches in den Mitochondrien zur Freisetzung von Cytochrom c und über Caspase-9 zur Aktivierung von Caspase-3 führt (s.u.). Eine zweite Möglichkeit liegt in der direkten Stimulation der CD95/Fas/APO-1 Signalkaskade durch Expressionsinduktion von Fas/APO-1 (Raff, 1998).

1.2.1.4.2. pRb/E2F

Dieses auf Chromosom 13q14 lokalisierte Tumorsuppressorgen kodiert für das Retinoblastomprotein (Evans & Farrar, 1992). Es gehört seiner Struktur nach neben p107 und p130 zur sogenannten pocket-protein-Familie (Weinberg, 1995). Knudson vermutete seine Existenz bereits 1971 im Rahmen seiner Untersuchungen des familiären Retinoblastoms. Später wurde seine gehäufte Mutation in Retinoblastomen nachgewiesen. Heute weiß man, dass dieses Gen auch in anderen Tumorsystemen von Mutationen betroffen ist. So findet sich auch im kleinzelligen Lungenkarzinom häufig ein LOH bei 13q, und es gibt Hinweise, dass der pRb-Locus dabei betroffen ist (Ewen et al., 1993). Aber auch das Osteosarkom, das Prostatakarzinom und das Mammakarzinom sind häufig betroffen (Friend et al., 1986; Lee et al., 1988; Bookstein et al., 1990).

Die Rolle von pRb in gesunden Zellen ist noch nicht vollständig geklärt. Allerdings wird ein direkter Einfluss auf den Zellzyklus vermutet, zumal der Phosphorylationsstatus von pRb den Zyklus direkt beeinflusst (Ferrel et al., 1991). pRb fungiert wie p53 erwiesenermaßen als potenter Transkriptionsfaktor (Chan et al., 2001). Seine intakte Funktion ist notwendig für den regelrechten G1-S-Übergang. In

hypophosphoryliertem Zustand bindet es Proteine der E2F-Familie, die ungebunden als Transkriptionsfaktoren für die Gene dienen, die für den G1-S-Übergang notwendig sind (Harbour & Dean, 2000; Weinberg, 1995). Mittlerweile sind sechs Mitglieder der E2F-Familie mit verschiedenen DNA-bindenden Aktivitäten bekannt, die durch die Mitglieder E2F-1-6 zusammen mit ihren heterodimeren Partnerproteinen DP1 und DP2 repräsentiert werden (zur Übersicht siehe Sears et al., 1997). Die Mehrheit der von E2F regulierten Gene sind entweder in die Zellzyklusprogression, oder direkt in die DNA-Synthese involviert. Hierzu gehören unter anderem die DNA Polymerase α (Pearson et al., 1991), die Dihydrofolatreduktase (Blake et al., 1989), CDC25A (Vigo et al., 1999), die G1- Cykline A und E (Schulze et al., 1995; Ohtani et al., 1995; Geng et al., 1996) sowie E2F-1 und -2 selbst (Hsiao et al., 1994; Sears et al., 1997). Neben der Inhibition der E2F-abhängigen Expression wirkt der Rb/E2F-Komplex in Kombination mit den *histone de-acetylating complexes* (HDAC) HDAC-1, -2, und -3 selbst als aktiver Repressor der Transkription abhängiger Gene (Brehm et al., 1998).

Es sind mittlerweile 97 Targetgene des Rb-Pathway bekannt (Vernell et al., 2003). Über seine Interaktion mit E2F reguliert es auch Gene, die die Apoptose kontrollieren.

E2F induziert die Expression des proapoptotischen Apaf-1, und auch eine Rolle für den Zelltod nach DNA-Schaden wird für E2F vermutet (Blattner et al., 1999; Moroni et al., 2001), sodass für pRb darüber weiterhin ein antiapoptotischer Effekt vermutet werden kann (Fan et al., 1996; Pucci et al., 2000).

1.2.2. Apoptose

Apoptose ist ein deskriptiver Name, mit dem man den Prozess des programmierten Zelltodes bezeichnet (Fraser & Evan, 1996). Durch diesen Vorgang kontrolliert ein Organismus die Zahl der Zellen. Während der Apoptose aktiviert die Zelle einen Mechanismus, der sie systematisch zerstört. In der Zellmembran entstehen Membranschäden („blebs“), auf der Oberfläche erscheinen pro-phagozytotische Signale, die Zelle wird kompakter, das Chromatin kondensiert und die DNA zerfällt (Wyllie, 1993; Böcker/Denk/Heitz – Pathologie, 3. Aufl, Kap. 2.6.4, Urban&Fischer). Die Reste einer apoptotischen Zelle werden als „apoptotic bodies“ bezeichnet und rasch von umgebenden Zellen phagozytiert. Für die Apoptose gibt es diverse Auslöser, wie beispielsweise den Entzug von Wachstumsfaktoren, Glucocorticoidtherapie, Hypoxie, mikrobiellen Befall, Gamma-Strahlung, die Induktion bestimmter Signalkaskaden über Zelloberflächenrezeptoren oder einen Angriff von zytotoxischen T-Helfer-Zellen

(Böcker/Denk/Heitz – Pathologie, 3. Aufl, Kap. 2.6.4, Urban&Fischer). Im Folgenden soll auf die wichtigsten Mechanismen der Apoptose eingegangen werden.

1.2.2.1. Intrazelluläre Apoptoseinduktion und -durchführung

Auf molekularer Ebene führen insbesondere zwei Aktivierungswege, nämlich der p53/Bax (s.o.) sowie der über die Rezeptorengruppen TNF-R und CD95/Fas vermittelte Weg zu einem gemeinsamen finalen Effektorsystem, das den Zelltod induziert. Für Induktion und die definitive Durchführung der Apoptose sind spezielle Proteasen notwendig, deren Prototyp das „Interleukin-1 β -converting enzyme“ (ICE) darstellt (Fraser & Evan, 1996). ICE-verwandte Proteasen enthalten alle die Aminosäure Cystein in ihrem aktiven Zentrum, spalten ihr Zielprotein *c*-terminal an einer spezifischen Asparaginsäure und werden daher auch *Caspasen* genannt. In der Zelle werden sie als inaktive Vorläufer synthetisiert, sogenannte Procaspsen, die selbst wieder an einer spezifischen Asparaginsäure durch eine andere Caspase prozessiert werden. So setzen sie eine proteolytische Kaskade in Gang (Raff, 1998).

Zunächst erhöhen die proapoptotischen und p53-abhängigen Bax-Proteine die Permeabilität der Mitochondrienmembran für Cytochrom c. Dies wird somit durch einen spannungsabhängigen Ionenkanal in der Mitochondrienmembran, VDAC („voltage dependent anion channel“), in das Zytosol exportiert. Während die proapoptotischen Proteine Bax und Bad eine Öffnung des VDAC-Kanals beschleunigen, schließen antiapoptotische Proteine wie bcl-2 und bcl-xl den Kanal durch direkte Bindung (Shimizu et al., 1999; Martinou, 1999). Nach Induktion der Apoptose liegt Procaspace-9 im Komplex mit weiteren Bestandteilen des Effektorsystems, nämlich Apaf-1, dATP und nunmehr zytoplasmatisch lokalisiertem Cytochrom c vor, was zu einer Selbstspaltung der Caspase-9 und somit zu ihrer Aktivierung führt (Zou et al., 1997; Li et al., 1998). Caspase-3, die durch Caspase-9 aktiviert wird, ist als letztlich ausführendes Glied der Kaspase-Reihe für die Spaltung zytoplasmatischer Proteine, die Membranveränderungen sowie die Chromatin-Kondensation und die DNA-Degradation mittels der Aktivierung von Nukleasen verantwortlich (Woo et al., 1998; Böcker/Denk/Heitz – Pathologie, 3. Aufl, Kap. 2.6.4, Urban&Fischer).

1.2.2.2. Das TNF- und CD95/Fas/APO-1- Rezeptor System

Der „Tumor Necrosis Factor Receptor 1“ (TNFR1) und CD95/Fas/APO-1 gehören zur „Tumor Necrosis Factor Receptor“- Familie (Fraser & Evan, 1996). Sie sind beide in der Lage, über ihre Liganden – den Tumornekrosefaktor (TNF) und den Liganden des Oberflächenantigens CD95 (CD95L) – Apoptose zu induzieren. Während TNF ein weitverbreitetes Zytokin ist, findet man den CD95 Liganden hauptsächlich an der Oberfläche von zytotoxischen T-Helfer-Zellen. Charakteristisch für beide Rezeptoren ist eine intrazelluläre Domäne aus ungefähr 70 Aminosäuren, die evolutionär hoch konserviert ist. Diese „death domain“ ist wesentlich an der Signaltransduktion beteiligt. So rekrutieren sie nach Ligandenbindung weitere Proteine, die eine „death domain“ enthalten. Für CD95 ist dies das Protein FADD. Demgegenüber benötigt TNFR1 zunächst TRADD als Adapterprotein, um schließlich auch FADD zu binden. Im Anschluß an die Bildung des CD95-FADD bzw. TNFR1-TRADD-FADD Komplexes wird von beiden die Caspase-8 rekrutiert, was in einer Aktivierung der Caspase-3 und letztendlich in der Auslösung der Apoptose mündet. Für den CD95/Fas-Rezeptor gibt es abhängig vom Zelltyp noch eine weitere Möglichkeit, Apoptose zu induzieren. Im Anschluß an die Rekrutierung von Caspase-8 kommt es über Bid, ein proapoptotisches Mitglied der bcl-2 Familie, zur Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien in das Zytoplasma, was wiederum über den oben bereits genannten Weg zur Apoptose führt (Fraser & Evan, 1996).

1.3. Das Myc-Gen

Die Familie der Myc-Proteine bildet eine Gruppe potenter Onkogene, die zahlreiche Targetgene aktivieren oder unterdrücken können. Regulationsstörungen des Myc-Gens oder veränderte Expressionslevel des Myc-Genproduktes sind eine der häufigsten Veränderungen in malignen Tumoren überhaupt (Cole, 1986; Henriksson & Lüscher, 1996; Marcu et al., 1992). Zu den Erkrankungen, in denen Myc in die Karzinogenese involviert ist, zählen unter anderem das Burkitt-Lymphom, Mamma-Karzinome, Prostata-Karzinome, kleinzellige Lungentumore, Schilddrüsenkarzinome, das Retinoblastom, gastrointestinale Karzinome und Melanome. Neben erhöhter Expression des Myc-Genes kommt es auch zu genomischen Veränderungen in Form einer intra- oder extrachromosomalen Amplifikation des Genlocus, sowie zu Translokationen (zur Übersicht siehe Nesbit et al., 1999).

Es existieren vier eng verwandte Myc-Proteine (c-Myc, N-Myc, L-Myc, b-Myc). Bis auf b-Myc haben alle dokumentiertes onkogenes Potential (Birrer et al., 1988; Schwab et al., 1985; Yancopoulos et al., 1985) und ähnliche DNA-Bindeeigenschaften (Mukherjee et al., 1992). Für b-Myc ist dagegen nachgewiesen, dass es Transformation, c-Myc-induzierte Transkription sowie Proliferation sogar inhibiert (Resar et al., 1993; Gregory et al., 2000). c-Myc wurde erstmalig als zelluläres Gegenstück des viralen transformierenden Onkogens v-Myc beschrieben (Roussel et al., 1979).

Die Myc-Onkoproteine fungieren als Transkriptionsfaktoren. Obwohl jedoch eins oder mehrere der Proteine in allen wachsenden Zellen exprimiert werden, findet sich mit konventionellen „*electrophoretic mobility shift assays*“ kein Myc-DNA-Komplex, weil die Bindung von Myc an die DNA zu schwach ist (Cowling & Cole, 2006). Neben der Induktion von zellulärer Proliferation und Apoptose ist für Myc insbesondere auch die Deregulation antiproliferativ wirkender Mechanismen gezeigt. Es konnte für Myc nicht nur eine direkte transkriptionelle Aktivierung verschiedener an der Progression des Zellzyklus beteiligter Gene, sondern auch die spezifische Repression antiproliferativer Zellzyklus-Komponenten sowie eine direkte Beeinflussung der Zellalterung nachgewiesen werden. Weitere Funktionen von Myc sind maligne Transformation von Zellen, Immortalisierung und Blockade der Zelldifferenzierung (Askew et al., 1991; Cole, 1986; Evan & Littlewood, 1998; Freytag et al., 1990; Henriksson & Lüscher, 1996; Marcu et al., 1992). Myc ist für eine effiziente Progression des Zellzyklus erforderlich (Goruppi et al., 1994; Prochownik et al., 1988; Yokoyama & Imamoto, 1987). Die Deregulation zellulärer Kontrollpunkte der Proliferation sowie die Interaktion mit antiproliferativen Signalen stellt eine wesentliche Möglichkeit für die Wirkungsweise von N-Myc in humanen Neuroblastomen dar.

1.3.1. Myc-Struktur und funktionelle Domänen

Myc ist ein basisches (b) Protein mit einer *helix-loop-helix*- (HLH-)Struktur und einem *leucine-zipper* (LZ) (Henriksson & Lüscher, 1996; Lemaitre et al., 1996). Es lässt sich nach seiner Struktur und Funktion in mehrere Teile unterteilen. Die C-terminale Domäne beinhaltet das b/HLH/LZ-Motiv, das sowohl die Oligomerisation als auch die DNA-Bindung vermittelt (Blackwell et al., 1990; Blackwood & Eisenmann, 1991; Prendergast et al., 1991).

Die N-terminale Transaktivierungsdomäne kann unterteilt werden in kleinere evolutionär hoch konservierte Domänen. Bei der Sequenzierung durch Stone et al.

wurde nach den Domänen, die für Myc-induzierte Transformation nötig sind, gesucht (Stone et al., 1987). Dabei fand man heraus, dass 2 konservierte Regionen, die Myc Homology Boxes I und II, MBI und MBII, nötig sind für die Kooperation mit H-Ras, um in primären Rattenembryo-Fibroblasten Transformation zu induzieren. Auch wurden sie als notwendig für Myc-induzierte Apoptose und Differenzierungsblock beschrieben (Evan et al., 1992; Freytag et al., 1990). Kürzlich wurden 2 weitere MB beschrieben. MBIII ist nötig für Zelltransformation, seine Deletion dagegen verstärkt die Myc-induzierte Apoptose (Herbst et al., 2005). MBIV ist auch nötig für volle Transformationsaktivität durch Myc und für Apoptose, seine Deletion verstärkt den Myc-induzierten G2-Arrest (Cowling et al., 2006). MBIII- und MBIV-Mutanten zeigen Defekte in der Aktivierung und Repression verschiedener Myc-Targetgene.

MBI, MBIII und MBIV sind nicht für die Proliferation nötig (Herbst et al., 2005; Cowling et al., 2006; Xiao et al., 1998). Obwohl Myc ohne MBII weder Transformation noch Apoptose, Differenzierung und G2-Arrest bewerkstelligen kann (Stone et al., 1987; Evan et al., 1992; Freytag et al., 1990; Cowling et al., 2006), ist es nur teilweise daran gehindert, Proliferation zu induzieren (Bush et al., 1998; Nikiforov et al., 2000). Des Weiteren zeigen Myc-Mutanten, bei denen die MBII-Deletion mit Deletionen von MBI, MBIII oder MBIV kombiniert ist, keine Schwächung der Proliferationsaktivität von MBII (Cowling & Cole, 2006). Eine Deletion der MBII-Domäne reduziert die Transaktivierungsfunktion von Myc dramatisch (Cowling et al., 2006). Es zeigt sich jedoch, dass Myc Δ MBII weitestgehend die gleichen Gene hochreguliert wie MycWT, bloß etwas schwächer. Diese Beobachtung deckt sich mit der obigen Analyse von MBII und legt wie diese nahe, dass für die Proliferation nur eine schwache Transaktivierung nötig ist. Warum MBI für Transformation, nicht aber für Transkription nötig ist (Herbst et al., 2005; Oster et al., 2003; Kato et al., 1990), bleibt ein Rätsel, legt aber Transkriptions-unabhängige Funktionen von Myc nahe. Die Deletion von MBIII oder MBIV reduziert die Transaktivierung, allerdings nicht annähernd so stark wie die Deletion von MBII (Herbst et al., 2005; Cowling et al., 2006).

1.3.2. Funktionsweise von Myc

Da v-Myc ein nukleäres Protein war (Hann et al., 1983), erforschten viele Gruppen, ob Myc ein Transkriptionsfaktor ist, indem sie die transkriptionelle Antwort verschiedener Gene auf die Myc-Expression untersuchten (Dean et al., 1987; Prendergast & Cole, 1989). Mit der Entdeckung von Max, einem kleinen ubiquitär exprimiertem Protein, das

eine ganze Reihe von b/HLH/LZ-Proteinen binden kann (Baudino & Cleveland, 2001), wurde Myc vollständig als Transkriptionsfaktor etabliert (Blackwood & Eisenmann, 1991). Max kann homodimerisieren und direkt DNA binden, während Myc nicht homodimerisieren kann und, um DNA zu binden, ein Heterodimer mit Max bilden muss (Blackwood & Eisenmann, 1991). Später entdeckte man, dass Myc-Max-Heterodimere relativ schwache Transaktivierungsaktivität aufweisen (Kretzner et al., 1992). Nachfolgende Untersuchungen verschiedener Targetgene zeigten vergleichbare Induktion einiger Promotoren, was Myc sowohl endogen als auch in „*transient assays*“ als vergleichsweise schwachen Transkriptionsfaktor etablierte (Bush et al., 1998). Eine Fülle kürzlicher Microarray-Studien zeigten, dass Myc die Mehrheit seiner Targetgene lediglich zweifach aktiviert (Patel et al., 2004).

1.3.2.1. Myc als Antagonist von Mnt

Manche Zellen mit hoch amplifiziertem und überexprimiertem Myc-Gen haben einen detektierbaren Myc/Max-DNA-Bindungskomplex (Sommer et al., 1998). Die Kern-Extrakte der meisten Zellen jedoch weisen andere Komplexe auf, die dieselbe Sequenz binden. Die beiden wichtigsten sind USF und Mnt/Max (Baudino & Cleveland, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass beide Faktoren an Myc/Max-Targets binden, vor allem bei Unterdrückung von Myc (Boyd & Farnham, 1999; Hurlin et al., 2004; Orian et al., 2003). Folglich stehen Myc/Max-Heterodimere in steter Konkurrenz mit USF und Mnt/Max um die Regulation der Targetgen-Expression, obwohl man nicht weiß, ob das Spektrum der binding sites vollständig überlappt (Orian et al., 2003). Im Gegensatz zu Myc/Max rekrutieren Mnt/Max-Komplexe Sin3/HDAC-Repressoren zwecks Unterdrückung der Genexpression statt zu ihrer Aktivierung (Hurlin et al., 1997; Meroni et al., 1997). Damit geht überein, dass ein Mnt-Knockdown zu hyperproliferativen Zellen führt oder dass der Wachstumsdefekt in c-Myc-/Fibroblasten aufgehoben wird (Hurlin et al., 2004; Nilsson et al., 2004; Toyooka et al., 2004). Weiterhin können Mnt-defiziente Zellen durch ein H-Ras-Onkogen vergleichbar transformiert werden, wie es bei einer Myc-Überexpression mit H-Ras geschieht. Außerdem werden einige Myc-Targetgene durch einen Mnt-Knockdown induziert (Cowling & Cole, 2006).

1.3.2.2. Die E-Box

Die am stärksten affine Bindestelle für Myc/Max-Heterodimere aus in-vitro-Studien ist C/GACCACGTGGTG/C (Berberich et al., 1992; Blackwell et al., 1993). Myc/Max-Dimere bevorzugen C/G-Sequenzen, die den Kern CACGTG, genannt E-Box, flankieren. USF dagegen bindet bevorzugt A/T-flankierte Sequenzen (Boyd & Farnham, 1997). In vivo scheint für die Targetgene nur der Kern CACGTG erforderlich zu sein (Fernandez et al., 2003).

1.3.2.3. TRRAP

TRRAP gilt als essentieller Kofaktor für Myc und bindet direkt an den Myc-N-Terminus (McMahon et al., 1998). TRRAP steht für „TRansactivation/tRansformation Associated Protein“ und ist ein 3830 Aminosäuren großes Protein. Myc bindet direkt an eine interne Domäne von TRRAP (Park et al., 2001; Brown et al., 2001). Die Stärke der Bindung zu TRRAP korreliert mit Transformationsfähigkeit des jeweiligen Mycs. Deletionen in MBI und MBII, die die Transformation inhibieren, hemmen auch die TRRAP-Bindung; L-Myc, das unter den Myc-Proteinen nur eine sehr schwache Transformationsfähigkeit hat, bindet TRRAP kaum (Nikiforov et al., 2002; McMahon et al., 1998). Des Weiteren hemmt eine Reduktion der TRRAP-Expression die Myc-induzierte Transformation (McMahon et al., 1998). TRRAP ist Teil des 1,8 MDa großen und ca. 20 Proteine enthaltenden (Grant et al., 1997) SAGA-Komplexes (SPT/ADA/GCN5/Acetyltransferase) (Grant et al, 1998; Saleh et al., 1998; Vassilev et al., 1998). Die Funktion vieler darin enthaltener Proteine ist nach wie vor unbekannt. Nachgewiesene enzymatische Aktivität zeigt sich für die Histon-Acetyltransferase (HAT) GCN5. Histonacetylierung wird generell mit Genaktivierung durch eine „Histon-Code“ in Verbindung gebracht (Grant et al, 1998; Strahl & Allis, 2000). Für Myc ist bekannt, dass es HAT-Aktivität rekrutiert (McMahon et al., 1998; Liu et al., 2003).

1.4. Fragestellung

Als entscheidendes molekulares Prognosekriterium für Neuroblastompatienten hat sich die Amplifikation des N-Myc-Genes etabliert. Kinder mit amplifiziertem N-Myc-Gen haben eine signifikant schlechtere Überlebenswahrscheinlichkeit als solche ohne. Unklar bleibt jedoch der genaue Mechanismus, über den N-Myc seinen Einfluss geltend macht. Für N-Myc ist sowohl eine Steigerung der Proliferation als auch eine Steigerung der Apoptose beschrieben worden. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es herauszufinden, ob es zwischen N-Myc-Amplifikation, Proliferations- und Apoptoserate sowie Prognose einen Zusammenhang gibt beziehungsweise ob die Prognoseverschlechterung durch N-Myc-Amplifikation über ihre Wirkung auf Proliferation und Apoptose zu erklären ist.

2. Material und Methoden

2.1. Tumormaterial

Die für die Experimente erforderlichen Tumorproben primärer Neuroblastome wurden freundlicherweise von Herrn Professor Dr. med. Christiansen vom Medizinischen Zentrum für Kinderheilkunde der Universität Marburg zur Verfügung gestellt. Gemäß den Richtlinien der aktuellen Neuroblastomstudie NB2004 der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) und deren Vorläufer werden bundesweit Biopsate oder Resektate primärer Neuroblastome zur weiteren Untersuchung der Studienzentrale in Köln und weiteren Referenzlaboren postalisch zugesandt, darunter auch das Neuroblastomlabor der Universitätsklinik Marburg unter Leitung von Professor Dr. med. Christiansen. Hier wird das Tumormaterial sofort aufgearbeitet und bei -80°C eingefroren. Routinemäßig wird von jeder Probe die Amplifikation von N-Myc bestimmt. Die weiteren klinischen Daten wie das Tumorstadium entstammen den einsendenden Kliniken.

Die in dieser Arbeit verwendeten Proben wurden der in der Kinderklinik Marburg etablierten Tumorbank entnommen und stellen hinsichtlich der Stadien- und Altersverteilung eine annähernd repräsentative Gruppe der bundesweiten Gesamtneuroblastome dar.

2.2. CyklinA-Western Blot

2.2.1. Material

2.2.1.1. Herstellung von Proteinlysaten aus primären Tumoren

Lysepuffer: 150mM NaCl, 1% (v/v) NP-40 (Sigma), 50mM Tris-Puffer pH 8, Lagerung: $+4^{\circ}\text{C}$

Proteaseinhibitoren: Aprotinin (Boehringer Mannheim) 5mg/ml in PBS, Leupeptin (Boehringer Mannheim) 5mg/ml in H_2O , Pepstatin (Boehringer Mannheim) 1mg/ml in Methanol, PMSF Phenylmethylsulfonylfluorid) 0,2M in Ethanol, alle Proteaseinhibitoren 1:1000 in Lysepuffer verdünnt einsetzen

2.2.1.2. Proteinbestimmung nach Bradford

Bradford Reagenz: 0,01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-25, 4,75% (v/v) Ethanol
10% (v/v) Ortho-Phosphorsäure in H₂O filtrieren, lichtgeschützt lagern

Referenz Stocklösung BSA: (Fraktion V, AppliChem) 1mg/ml in Lysepuffer

Sonstiges: 0,15M Natriumchlorid-Lösung

2.2.1.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Sammelgelpuffer: 0,5M Tris / HCl pH 6,8, 0,4% (w/v) SDS

Trenngelpuffer: 1,5M Tris / HCl pH 8,8, 0,4% (w/v) SDS, 8mM EDTA

Laufpuffer pH 8,3: 25mM Tris, 0,2M Glycin, 0,1% (w/v) SDS

Acrylamidstammlösung: 30% (w/v) Acrylamid, 0,8% (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid
in H₂O, Lagerung : +4° C, lichtgeschützt

3x SDS Probenpuffer: 4,8ml 4x Trenngelpuffer, 0,6g SDS (6% SDS), 0,420g DTT
(0,3M DTT), kleine Spatelspitze Bromphenolblau, 3,5ml Glycerin, ad 10ml in H₂O

APS: Ammoniumpersulfat 10% (w/v) in H₂O

TEMED: Tetramethylethyldiamin

Isopropanol (Roth) 100%

Molekulargewichtsmarker: Full Range Rainbowmarker RPN 800 (Amersham),
Low Range Rainbowmarker RPN 755 (Amersham)

2.2.1.4. Western-blot

Blotpuffer: 20% (v/v) Methanol, 150mM Glycin, 20mM Tris-Base

Blocklösung: 5% (w/v) Magermilchpulver, 0,01% (w/v) Gelatine (Fluka), 0,2% (v/v)

Tween-20 in 1x TBS

20x TBS pH 7,4: 1M Tris/HCl, 3M NaCl

TBS-T pH 7,4: 20% (v/v) 20x TBS pH 7,4, 0,2% Tween-20

Methanol: 100% (zur Behandlung der PVDF-Membran)

PVDF-Membran: Immobilon-P, Transfer Membran (Millipore)

Entwicklerlösungen:

ECL Western blotting Detektions-Reagenzien 1 und 2 (Amersham)

ECL Western blotting Detektions-System Lösung A und B (Amersham)

Film: ECL Hyperfilm (Amersham)

Verwendete Antikörper:

Cyklin A:

Anti-Cyklin A Antikörper (Kaninchen), polyklonal 200µg IgG/ml, (Santa-Cruz); 1:1000 verdünnt eingesetzt.

CDK2:

Anti-CDK2 Antikörper (Kaninchen), polyklonal; 200µg IgG/ml, (Santa-Cruz); 1:1000 verdünnt eingesetzt

Zweitantikörper – Spezies Maus:

Peroxidase gekoppelter anti-Maus IgG Antikörper (Amersham); 1:3000 verdünnt eingesetzt

Zweitantikörper – Spezies Kaninchen:

Peroxidase gekoppelter anti-Kaninchen IgG Antikörper (Amersham); 1:3000 verdünnt eingesetzt

2.2.2. Methode

2.2.2.1. Herstellung von Proteinlysaten aus primärem Tumorgewebe

Um die Proteine eines Gewebes untersuchen zu können, muss das Gewebe zunächst aufgeschlossen werden, damit die Proteine frei zugänglich werden. Dazu wird pro Probe ca. 30 mg Tumorgewebe in möglichst noch gefrorenem Zustand in ein 1,5ml Eppendorfgefäß übertragen und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Mit einem Teflonmörser wird das Gewebe grob zerkleinert, dann mit 300µl Lysepuffer versetzt und ein weiteres Mal gemörsert. Der Lysepuffer wird zuvor auf Eis pipettiert und mit verschiedenen Proteaseinhibitoren ergänzt, um einen Abbau der Proteine durch zelleigene Proteasen zu verhindern. Im Anschluss an den zweiten Mörserschritt wird die Probe dreimal der „freeze-thaw“-Methode unterzogen, d.h. dreimal erst in flüssigem Stickstoff schockgefroren und direkt danach im 37°C warmen Wasserbad wieder aufgetaut. Dem folgt eine 20minütige Inkubation auf Eis.

Als Konsequenz der Wirkung des Lysepuffers und des Temperaturstressses ist das Gewebe jetzt aufgeschlossen und wird zwecks Auftrennung der Bestandteile bei 14000 rpm und 4°C für 20 Minuten zentrifugiert. Die Zellfragmente setzen sich am Boden des Gefäßes ab, während die relevanten Proteine im Überstand gelöst vorliegen. Dieser wird abpipettiert und weiterverwendet, der Rest wird verworfen.

2.2.2.2. Proteinbestimmung nach Bradford

Grundlage dieser Methode ist die Kenntnis, dass sich das Absorptionsmaximum einer sauren Lösung aus Coomassie Brilliant Blau G250 (Bradford-Lösung) bei Proteinbindung von 465nm auf 595nm verschiebt, und dass diese Extinktionszunahme der Zunahme des Proteingehaltes annähernd proportional ist.

Zur Bestimmung des Proteingehaltes der Tumorzelllysate wird zunächst eine BSA-Referenzkurve erstellt. Dazu wird von einer BSA-Lösung (1mg/ml) 1µl, 2µl, 4µl, 6µl und 8µl jeweils mit 150 mM NaCl-Lösung auf 100µl aufgefüllt. Diese werden mit jeweils 1 ml Bradford-Lösung vermischt. In analoger Weise werden von den erstellten Proteinlysaten je 1µl und 2µl behandelt. Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur werden dann die Absorptionen der Proben und der Referenzen bei 595nm gegen einen Leerwert ohne Proteinlysate bestimmt. Anhand der so entstandenen BSA-Referenzkurve kann schließlich die Proteinkonzentration der Lysate abgelesen werden.

2.2.2.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine aus Zelllysaten erfolgt durch diskontinuierliche und denaturierende SDS-Gelelektrophorese. SDS tritt mit hydrophoben Bereichen der Proteine in nichtkovalente Wechselwirkungen, wodurch die Proteine denaturiert werden. Das Verhältnis von SDS-Molekülen zur Zahl der Aminosäuren ist dabei annähernd konstant. Infolge des kompletten Besatzes mit SDS und der vollständigen Entfaltung der Proteine werden Ladungsunterschiede komplett ausgeglichen. Alle Proteine sind jetzt negativ geladen und wandern dementsprechend im angelegten elektrischen Feld zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Moleküle hängt somit, abgesehen von der Durchlässigkeit der Gelmatrix, nur vom Molekulargewicht, also der Größe der Proteine, ab.

Die Trennmatrix besteht aus mit Bisacrylamid vernetztem Acrylamid. In dem niedrigprozentigen Sammelgel ermöglichen unterschiedliche Pufferbedingungen eine einheitliche Proteinfrent und eine optimale Auftrennung im Trenngel. Dieses ist je nach gewünschter Auftrennung 7- bis 15prozentig. Sowohl Sammel- als auch Trenngel werden durch Mischen von Acrylamid-Stammlösung (30% (v/v)) mit dem jeweiligen Gelpuffer im erforderlichen Verhältnis (im Sammelgel 5% (v/v)) hergestellt. Die Polymerisation ist eine durch den Zerfall von Peroxidsulfationen (APS 10% (w/v)) eingeleitete Radikalkettenreaktion. Die Radikale aktivieren Tetramethyldiaminmoleküle (TEMED 0,08%), deren Radikale die eigentlichen Initiatoren der Radikalkettenpolymerisation sind. Bis zum Abschluss der Polymerisation wird das Trenngel für den Erhalt einer waagerechten Oberfläche mit Isopropanol beschichtet. Auf diese Oberfläche wird nach Entfernung des Isopropanols das grobporige Sammelgel aufpolymerisiert.

Die aufzutrennenden Lysate werden mit dem jeweils halben Volumen 3x SDS versetzt, 5 Minuten bei 100°C inkubiert und schließlich in die Geltaschen pipettiert. Bei maximal 150 V lässt man nun die Proben in das Trenngel einlaufen, die eigentliche Trennung erfolgt mit Spannungen zwischen 40 und 250 V, je nach gewünschter Geschwindigkeit. Um später die Größe der aufgetrennten Proteine bestimmen zu können, wird ein Größenstandard in einer Spur mit aufgetrennt. Auf diese Weise können Größenunterschiede von 1 kDa (entspricht ca. 10 Aminosäuren) detektiert werden. Als Ladekontrolle wird jede Spur zusätzlich mit einem spezifischen Antikörper gegen das ubiquitär exprimierte CDK2 untersucht. Zur Sichtbarmachung der aufgetrennten Proteinbanden dient der eigentliche Western-Blot.

2.2.2.4. Western-Blot

Sobald die Proteine auf der anodischen Seite des Gels ausgetreten sind, werden sie mittels einer transversal zur Oberfläche des Gels angelegten Spannung innerhalb der Blot-Apparatur auf die Nitrocellulose-Membran transferiert, wobei die Positionen der einzelnen Proteinbanden zueinander beibehalten werden. Infolge der mit diesem Schritt einhergehenden Immobilisierung der Banden werden sie somit immunologischen Nachweisreaktionen zugänglich. Dazu wird die Membran in einer Lösung inkubiert, die für das gesuchte Protein spezifische Antikörper enthält. Nach Auswaschung des Antikörperüberschusses wird sie mit einer Lösung inkubiert, die gegen die Fc-Domäne des Erstantikörpers gerichtete Zweitantikörper enthält. Letztere sind mit Horseradish-Peroxidase als Markierung gekoppelt, deren enzymatische Reaktion einen hochspezifischen Nachweis des gesuchten Proteins ermöglicht. Mit den ECL-Reagenzien erzeugt die Peroxidase eine Chemolumineszenz, die sich auf entsprechenden Filmen nachweisen lässt.

Es wird also die Membran (PVDF-Membran Immobilon-P, Millipore) auf die Größe des Gels zugeschnitten und dann 1 Minute in 100% Methanol, 2 Minuten in Aqua und 5 Minuten in Blotpuffer inkubiert. Anschließend werden 3 Whatman-3M-Papiere von Blotpuffer durchtränkt und blasenfrei auf die Anode der Blot-Apparatur („semi-dry“, Bio-Rad) aufeinandergelegt. Darauf wird erst die Nitrocellulose-Membran und dann das Gel gelegt. Schließlich werden auch darauf noch einmal 3 durchtränkte Whatman-3M-Papiere gelegt und die Apparatur wird geschlossen. Durch Anlegen einer Spannung von 22 V für 30 Minuten werden die Proteine auf die Membran transferiert.

Zur Vermeidung unspezifischer Antikörperbindung wird die Nitrocellulose unmittelbar nach dem Proteintransfer für 2 Stunden bei Raumtemperatur in einer Blocklösung auf einem Schüttler inkubiert. Dadurch wird die Membran abgesättigt. Nachfolgend wird die Blocklösung ersetzt durch frische, mit dem Primärantikörper in angemessener Verdünnung versetzte Blocklösung. Darin wird wieder auf dem Schüttler inkubiert, wahlweise 3 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Darauf folgen zunächst zwei fünfminütige, dann zwei fünfzehnminütige Waschschrte mit TBS-T (1xTBS, 0,2% Tween-20). Nach Verdünnung (1:3000) des mit Horseradish-Peroxidase konjugierten Sekundärantikörpers mit der Blocklösung wird die Membran darin nun wiederum zwei Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Schließlich wird erneut mit TBS-T gewaschen, zweimal 5 Minuten, zweimal 15 Minuten und abschließend einmal 5 Minuten.

Die Entwicklung mit den ECL-Plus-Reagenzien ist der letzte Schritt. Zunächst werden die ECL-Lösungen A und B im Verhältnis 40:1 gemischt, die Nitrocellulose wird darin für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Bei zu erwartender starker Signalintensität werden alternativ die ECL-Reagenzien 1 und 2 im Verhältnis 1:1 verwendet, inkubiert wird dann nur eine Minute. Vor der Exposition wird die Membran von Klarsichtfolie umhüllt. Je nach erwarteter Signalstärke wird der ECL-Hyperfilm zwischen 1 Sekunde und 30 Minuten exponiert.

2.2.2.5. Bewertung des Western Blot

Die Schwärzung des ECL-Hyperfilms verhält sich in gewissen Grenzen proportional zur Menge an spezifisch gebundenem Antikörper und damit auch indirekt zur Menge an spezifisch detektiertem Protein. Die Bewertung der Proteinbanden erfolgt dann im Abgleich mit dem Signal der parallel bestimmten CDK2-Ladekontrolle. Alle Banden wurden unabhängig voneinander von zwei Untersuchern optisch ausgewertet und unterteilt in nicht oder kaum nachweisbare (-, negative Proliferation), deutlich nachweisbare (+, schwach positive Proliferation) und stark erhöhte Proteinbanden (++, stark positive Proliferation).

2.3. TUNEL – TdT-mediated dUTP nick end labelling

2.3.1. Material

2.3.1.1. Vorbereitung der Objektträger

Aceton (Riedel-de-Haen, Seelze), Aqua dest., Objektträger 26X76 mm, Polylysin, OT-Ständer

2.3.1.2. Kryoschnitte

Flüssiger Stickstoff, Pinzette, sterile Skalpelle, Kryotom, tissuetec-Medium, Paraformaldehyd (PFA)

2.3.1.3. TUNEL-Färbung

In situ cell death detection kit (Roche Applied Science, Mannheim), PBS (Sigma, Deisenhofen), Triton-X 0,1% (Serva, Heidelberg), Natriumzitat 0,1% (Sigma, Deisenhofen), DNase I 1mg/ml (Promega, Madison, WI, USA), Parafilm „M“

(Laboratory Film, American National Can™, Greenwich,CT,USA), 10xDNAse Puffer, Aqua

2.3.1.4. DAPI-Färbung

NP 40 0,1% (Calbiochem, La Jolla, CA USA) in PBS (Sigma, Deisenhofen), DAPI (4,6-Damidino-2-Phenylindol, 5µg/ml) (Sigma, Deisenhofen) 1:50 in NP40/PBS, DAPI 1:200 in DMSO

2.3.1.5. Sonstiges

Fluorescent mounting medium (Dako, Hamburg), Deckgläser 22x22mm, Petrischalen, 10 cm, Wärmeschrank, 37 °C

2.3.1.6. Auswertung der Schnitte

Mikroskop (Leica DM RB, Wetzlar), Kamera (Kappa CF 15/4 MCC), Software (LeicaQWin) Spot Advanced

2.3.2. Methode

2.3.2.1. Anfertigung der Kryoschnitte

Um eine optimale Haftung der Gewebeschnitte auf den Objektträgern zu gewährleisten, werden diese polylysinisiert. Dazu werden sie für mindestens 5 Minuten in Polylysin getaucht und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur oder für eine Stunde bei 37°C getrocknet.

Die Kryoröhrchen mit den zu untersuchenden Proben werden der –80°C-Kühltruhe entnommen und sofort in ein Gefäß mit flüssigem Stickstoff überführt, um ein Antauen des Gewebes während des Transportes und der Zwischenlagerung zu vermeiden. Am Kryotom mit einer Kammertemperatur von –15°C und einer Schnittblocktemperatur von –20°C werden dann nacheinander von jeder Probe vier 5 µm dicke Schnitte angefertigt, je zwei auf einen Objektträger. Dazu wird das Röhrchen aus dem Stickstoff in das Kryotom überführt und das Gewebestück mit einer geeigneten Pinzette dem Röhrchen entnommen. Je nach Größe der Probe, die bei Bedarf auch mit einem sterilen Skalpell zugeschnitten werden kann, wird auf einem Stempel etwas tissuetec-Medium aufgebracht. Dieses ist bei Raumtemperatur zähflüssig, erstarrt aber in der Kryokammer schnell zu einer festen weißen Masse. Gleich nachdem es aufgebracht ist, wird die Gewebeprobe mit einer Pinzette in das Medium auf den Stempel übertragen noch bevor

das Medium erstarrt. Um eine gute Schnittführung zu erhalten, empfiehlt es sich, das Gewebestück auch von oben mit TissuTec zu überziehen. Innerhalb einiger Sekunden bis Minuten erstarrt das Medium, das Gewebe ist eingebettet. Nun arretiert man den Stempel in der Schnitteinrichtung. Mit der Schlittenautomatik fährt man nun die Probe nah an die Klinge heran und fängt vorsichtig an, sich bei großer Schnittdicke (ca. 20 µm) in den Probenblock einzuschneiden. Ist eine geeignete Schnittfläche mit ausreichendem Gewebeanteil erreicht, wird die Schnittdicke auf 5 µm umgestellt, wobei zu beachten ist, dass der erste Schnitt nach der Umstellung noch immer die alte Schnittdicke hat. Ein gelungener Schnitt sollte sich flach unter die heruntergeklappte Schnittführung aus Plastik ziehen und daran locker haften bleiben. Dann kann der Schnitt nach Hochklappen der Schnittführung auf einen raumwarmen Objektträger aufgeschmolzen werden, indem dieser einfach von unten an den Schnitt herangeführt wird. Sollte der Schnitt nicht am Plastik haften bleiben, sondern auf dem Block liegen bleiben, kann er mit einer Pinzette vorsichtig auf einen kalten, zuvor einige Minuten im Kryotom gelagerten Objektträger übertragen werden. Durch die Wärme eines Fingers, der von der Gegenseite unter dem Schnitt an den Objektträger gedrückt wird, wird der Schnitt aufgeschmolzen. Sind alle vier Schnitte einer Probe angefertigt, werden die Objektträger entsprechend beschriftet, die Probe wieder ins Kryoröhrchen und dieses wieder in den flüssigen Stickstoff überführt. Nach Beendigung der Schnitte aller Proben werden die Röhrchen wieder vom Stickstoff in die -80°C-Kühltruhe eingelagert.

2.3.2.2. Färbung

Während der Apoptose kommt es zur Fragmentierung genomischer DNA (s.o.). Dabei entstehen sowohl niedermolekulare Doppelstrang-DNA-Fragmente als auch hochmolekulare Einzelstrangbrüche („nicks“). Diese DNA-Strangbrüche können durch enzymatische Färbung freier 3'-OH Enden mit modifizierten Nukleotiden detektiert werden: die spezifische Bindung von terminaler Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) an freie 3'-OH DNA-Enden führt zur Synthese eines Polydeoxynucleotid Polymers. So wird mit Hilfe von TdT biotinyliertes Deoxyuridin (dUTP) in DNA-Strangbrüche inkorporiert, welches durch Antifluorescein-Antikörper detektiert werden kann.

Vor der eigentlichen Färbung werden alle Schnitte in 3,7%igem Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Dazu werden sie unter dem Abzug vollständig mit PFA überschichtet und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird das PFA mit einer Pipette vorsichtig abgesaugt, ohne die Schnitte zu beschädigen, und verworfen. Die

Objektträger werden für weitere 30 Minuten in PBS gewaschen. Im Anschluss wird von den je zwei Objektträgern pro Probe nur einer entnommen, dessen zwei Schnitte als Positiv- und Negativkontrolle dienen sollen, während der andere mit den eigentlichen Probeschnitten noch etwas im PBS verweilt. Der Kontroll-Objektträger wird nun in der frisch zubereiteten Permeabilisationslösung (0,1% Triton- X in 0,1% Natriumzitrat) für zwei Minuten bei 4 °C inkubiert und danach wieder kurz in PBS gewaschen. Um den Schnitt der Positivkontrolle herum wird der Objektträger nun vorsichtig getrocknet, während der andere Schnitt feucht bleiben sollte. Nun wird der trockene Schnitt mit 10 µl des DNase-Mixes (je 2µl DNase, 1µl 10xDNase-Puffer, 7µl Aqua dest.) überschichtet und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dadurch werden im Gewebe Strangbrüche induziert, sodass die Färbung auf jeden Fall positiv ausfallen muss. Ca. 5 Minuten vor Beendigung der Inkubation werden auch die Probeschnitte, die noch im PBS stehen, entnommen und ebenfalls zwei Minuten in Permeabilisationslösung bei 4°C inkubiert und wieder kurz in PBS gewaschen. Nach den 30 Minuten Inkubation werden die Kontrollschnitte ebenfalls noch einmal in PBS getaucht. Danach werden alle Objektträger vorsichtig getrocknet. Die Proben und die Positiv-Kontrolle werden nun mit je 51µl TUNEL-Reaction-Mix bestehend aus 45µl Färbelösung und 5µl der Enzymlösung aus dem „In Situ Cell Death Detection Kit“ sowie 1µl DAPI (verdünnt 1:200 in DMSO) überschichtet. Auf die Negativkontrollen werden nur 50µl Färbelösung und 1µl DAPI pipettiert, sodass keine Färbereaktion stattfinden kann. Nachfolgend werden alle Schnitte mit kleinen Deckgläschen einzeln bedeckt, um eine gleichmäßige Verteilung der Färbung zu erzielen. Dabei darf es nicht zur Vermischung der Färbelösungen kommen. Danach werden die Objektträger für eine Stunde bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Schließlich werden alle Schnitte noch einmal in PBS getaucht und mit einem Tropfen fluorescent mounting medium von einem großen Deckgläschen bedeckt.

2.3.2.3. Auswertung

Sobald das mounting medium getrocknet ist und die Deckgläschen fest auf den Objektträgern haften, werden die Färbungen per Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet. Für die Kernfärbung (DAPI) wurde ein Fluoreszenzfilter der Wellenlänge 340 - 380 nm verwendet, während die TUNEL-Färbung bei einer Wellenlänge zwischen 450 und 490 nm ausgezählt wurde. Jede Probe wird nur dann ausgewertet, wenn die zugehörige Negativkontrolle eindeutig negativ und die zugehörige Positivkontrolle eindeutig

positiv ist. Alle Schnitte werden zur Dokumentation fotografiert. Für die Auswertung werden pro Schnitt mindestens 500 Zellen aus verschiedenen repräsentativen Gesichtsfeldern in der DAPI-Färbung bei mindestens 40facher Vergrößerung gezählt. Danach wird in der TUNEL-Fluoreszenz ermittelt, wieviele der gezählten Zellen positiv leuchten, ergo apoptotisch sind. Der gewonnene Wert wird in Prozent umgerechnet. Alle Schnitte wurden unabhängig voneinander von zwei Untersuchern ausgewertet und nach ihrem Mittelwert gruppiert in negative Apoptose (-, < 5%), schwach positive Apoptose (+, 5 – 15%) und stark positive Apoptose (++ , > 15%).

2.4. Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software SPSS Version 13 sowie Microsoft Excel und WinStat Version 2.0. Das Signifikanzniveau wurde auf $\alpha = 0,05$ festgelegt. Zur Berechnung der Korrelation zwischen verschiedenen Parametern wurde der Chi²-Test nach Spearman genutzt.

3. Ergebnis

3.1. Struktur der untersuchten Gruppe

Es wurden insgesamt 50 Primärtumorproben untersucht. Davon entstammten 29 (58%) männlichen und 21 (42%) weiblichen Patienten, was einem Geschlechterverhältnis von $w:m = 1:1,38$ entspricht. Die Verteilung auf die einzelnen Tumorstadien (1: 14%, 2: 14%, 3: 18%, 4: 44%, 4S: 10%) ist in Abb. 1 dargestellt.

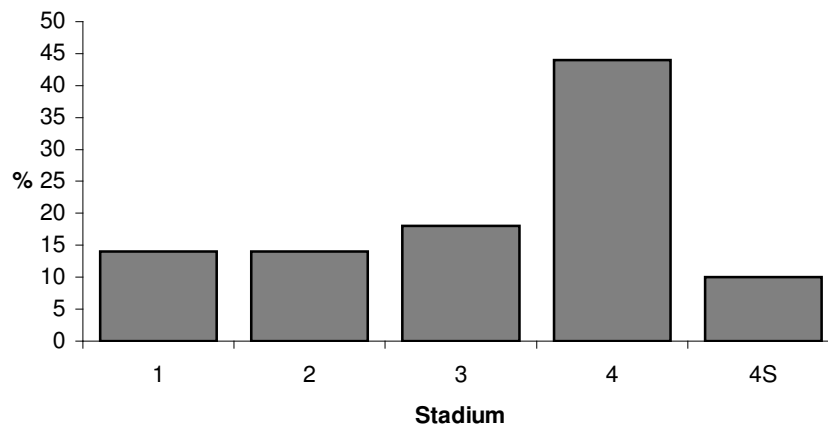


Abb. 1: Stadienverteilung

Von der Gesamtgruppe verstarben 42% der Patienten. Bei Erstdiagnose waren 28% jünger und 72% älter als 12 Monate. Das mittlere Alter bei Diagnosestellung beträgt 28,71 Monate, das mediane Alter 20,53 Monate. Von denen, die unter einem Jahr alt waren, verstarben 14,3%, während die Patienten über einem Jahr zu 52,8% verstarben.

3.2. Amplifikation des N-Myc-Gens

Bei 34 Proben (68%) handelt es sich um nicht N-Myc-amplifizierte Tumoren (mc-), 16 Proben (32%) waren N-Myc-amplifiziert (mc+). Bei den Patienten mit Erstdiagnose im ersten Lebensjahr sind 71,4% nicht amplifiziert, bei denen mit Erstdiagnose nach dem ersten Lebensjahr dagegen 66,7%. Unter den amplifizierten Patienten ist das prognostisch ungünstigere Stadium 4 im Vergleich zu den prognostisch günstigen wesentlich stärker vertreten (1: 0%, 2: 6,25%, 3: 18,75%, 4: 68,75%, 4S: 6,25%). Bei den nicht amplifizierten Patienten treten dagegen die prognostisch günstigen Stadien 1, 2 und 4S häufiger auf (1: 20,59%, 2: 17,65%, 3: 17,65%, 4: 32,35%, 4S: 11,76%) (s. Abb. 2).

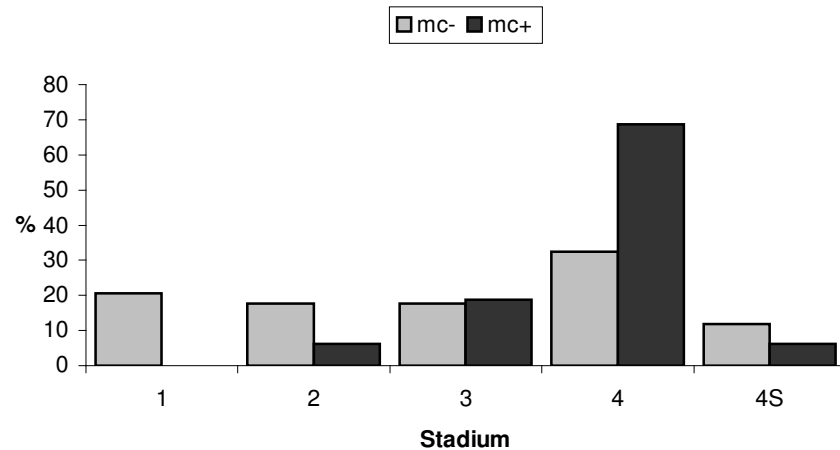


Abb. 2: Stadienverteilung in Abhängigkeit der N-Myc-Amplifikation

In der Gruppe der amplifizierten Patienten verstarben 68,8% der Patienten, in der der nicht amplifizierten dagegen 29,4%. Nach Kaplan-Meier-Analyse ergibt sich eine signifikant ($p = 0,010738$) bessere kumulative Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten ohne N-Myc-Amplifikation (s. Abb. 3). Von den nicht amplifizierten Patienten waren bei Erstdiagnose 29,41% unter einem Jahr alt, von den amplifizierten Patienten 25%.

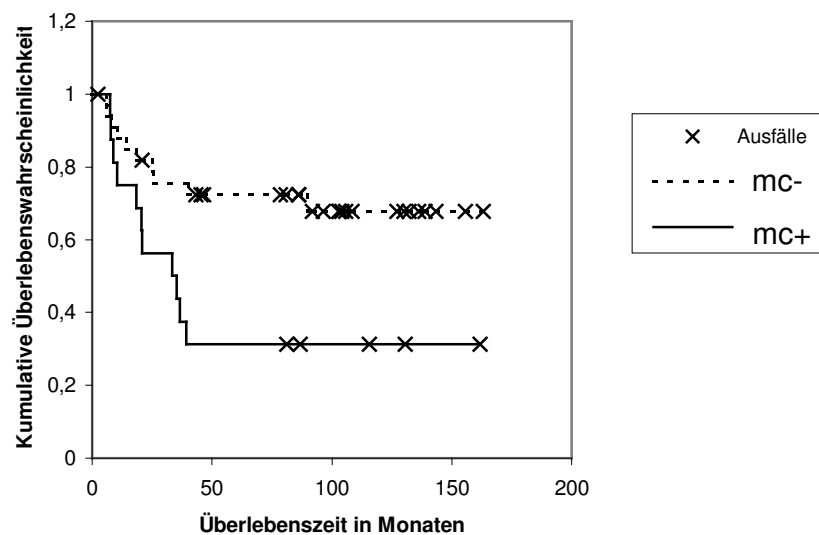


Abb. 3: Kaplan-Meier-Analyse gruppiert nach N-Myc-Amplifikation

3.3. Proliferation

Die Untersuchung der Proliferationsraten und die Kategorisierung in negative (-), schwach positive (+) und stark positive (++) Proliferation erfolgte mittels Cyklin A Western Blots (vgl. S. 34).

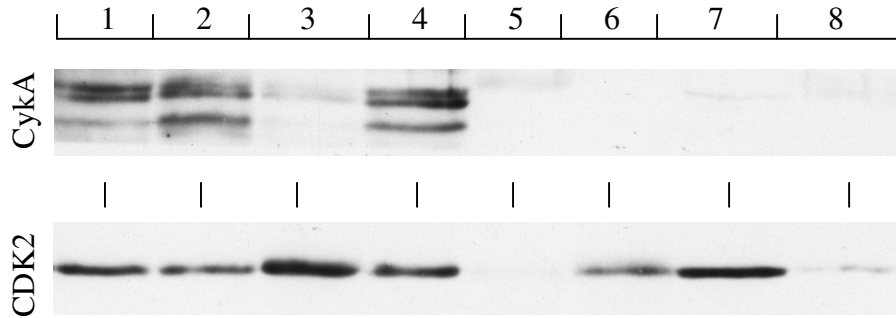


Abb. 4: Repräsentative Banden eines Western Blots für Cyklin A (oben) und der entsprechenden Ladekontrolle mit CDK2 (unten)

Von der untersuchten Gruppe wiesen 38% keine, 34% eine schwache und 28% eine starke Proliferation auf (s. Abb. 5).

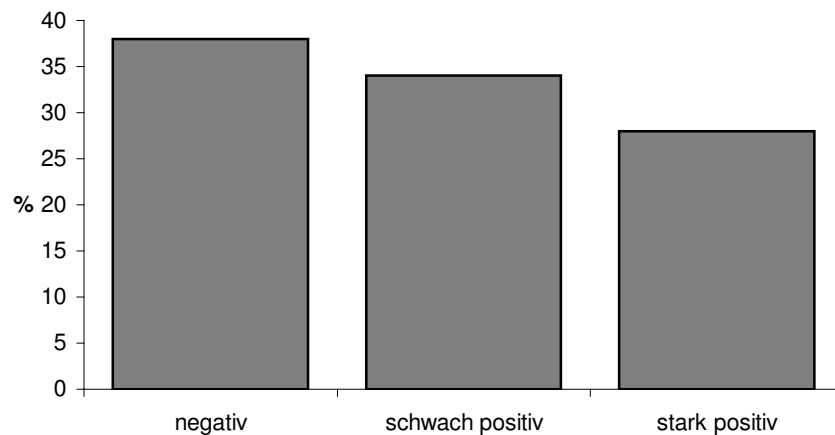


Abb. 5: Proliferationsraten

Im Vergleich der N-Myc-amplifizierten Tumoren mit den nicht amplifizierten ist festzustellen, dass die amplifizierten Tumoren weit häufiger starke Proliferation (+: 50%) aufweisen und stattdessen sowohl weniger negative (-: 25%) als auch schwach positive (+: 25%) Proliferation als die nicht amplifizierten (-: 44,12%, +: 38,24%, ++: 17,65%) zeigen (s. Abb. 6). Es ist also eine generelle Verstärkung der Proliferation unter N-Myc-Amplifikation zu beobachten.

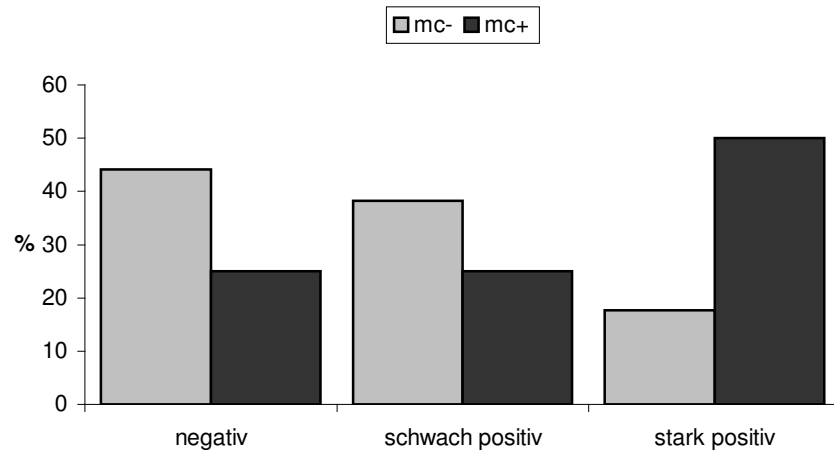


Abb. 6: Proliferationsraten in Abhängigkeit der N-Myc-Amplifikation

Im Vergleich der langzeitüberlebenden (*long term survival, lts*) mit den verstorbenen (*no survival, ns*) Patienten findet sich eine andere Verteilung der Proliferationsraten. Während die ns-Patienten vorwiegend schwach positive Proliferation (+: 42,86%) und seltener negative (-: 33,33%) oder stark positive (+: 23,81%) aufweisen, ist bei den lts-Patienten häufiger eine negative (-: 41,38%) und eine stark positive (+: 31,03%) Proliferation vorzufinden, schwach positive dagegen am wenigsten (+: 27,59%) (s. Abb. 7).

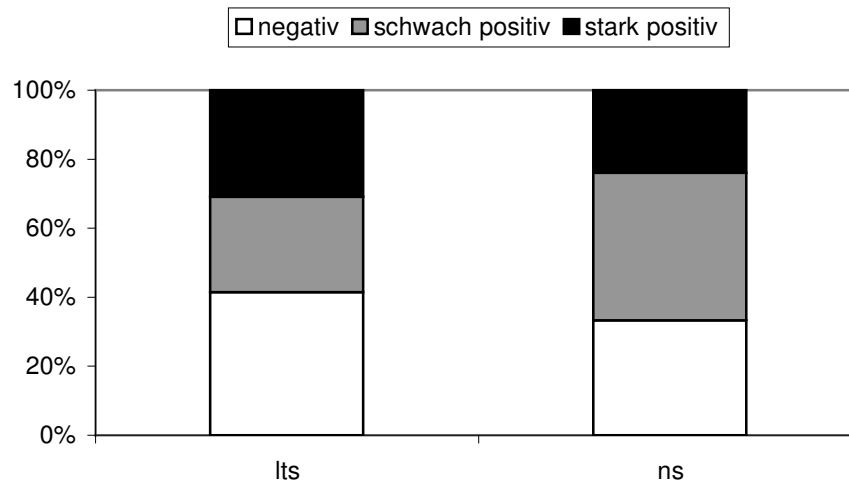


Abb. 7: Proliferationsraten in Abhängigkeit des Überlebens

Hinsichtlich der kumulativen Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit von der Proliferationsrate ergibt sich nach Kaplan-Meier-Analyse mit $p = 0,334633$, dass Patienten mit sowohl einer negativen aber auch einer stark positiven Proliferationsrate eine tendenziell bessere Überlebenswahrscheinlichkeit aufweisen, als solche mit schwach positiver Proliferation (s. Abb. 8).

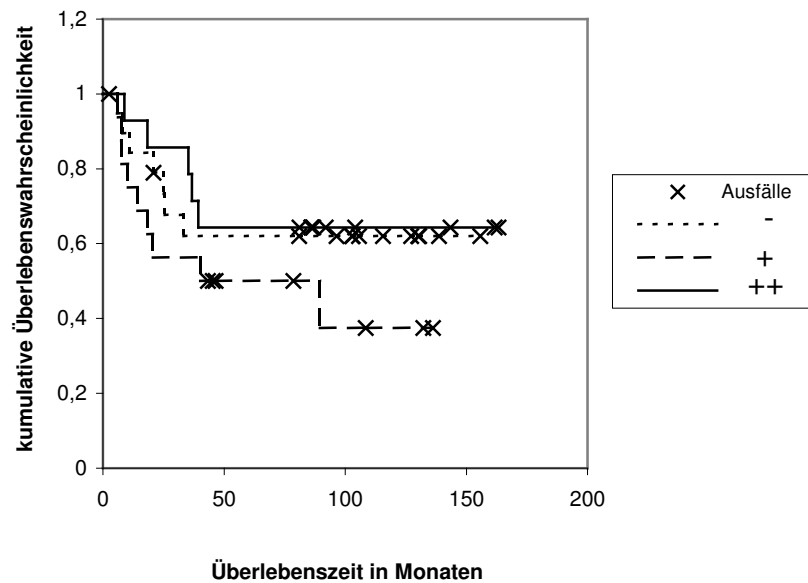


Abb. 8: Kaplan-Meier-Analyse gruppiert nach Proliferationsraten

Negative und schwach positive zusammen gegen stark positive Proliferation ergibt mit $p = 0,417184$ keine signifikant schlechtere, stattdessen eher eine bessere Überlebenswahrscheinlichkeit bei stark positiver Proliferation (Abb. 9). Umgekehrt ergibt sich beim Vergleich negativer mit schwach positiver und stark positiver Proliferation zusammen mit $p = 0,562351$ keine signifikant bessere Prognose bei negativer Proliferation (Abb. 10).

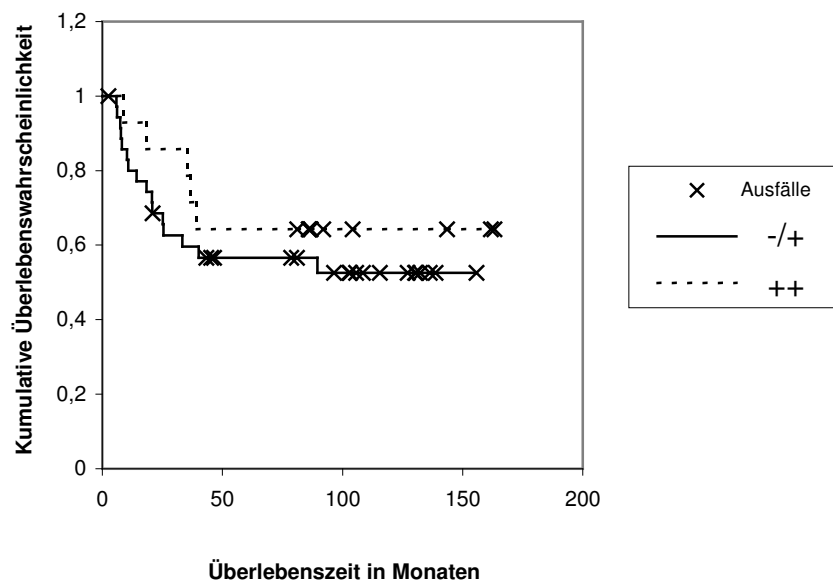


Abb. 9: Kaplan-Meier-Analyse gruppiert nach Proliferationsraten -/+ vs. ++

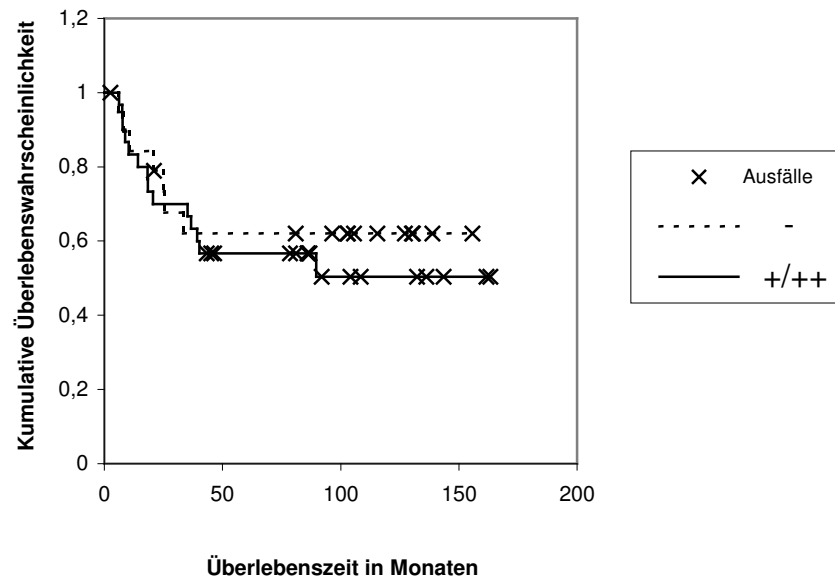


Abb. 10: Kaplan-Meier-Analyse gruppiert nach Proliferationsraten - vs. +/++

Vergleicht man negative und stark positive Proliferation zusammen mit schwach positiver Proliferation, ergibt sich mit $p = 0,142392$ nach Kaplan-Meier-Analyse dagegen eine tendenziell, wenn auch nicht signifikant, schlechtere Prognose bei schwach positiver Proliferation (Abb. 11).

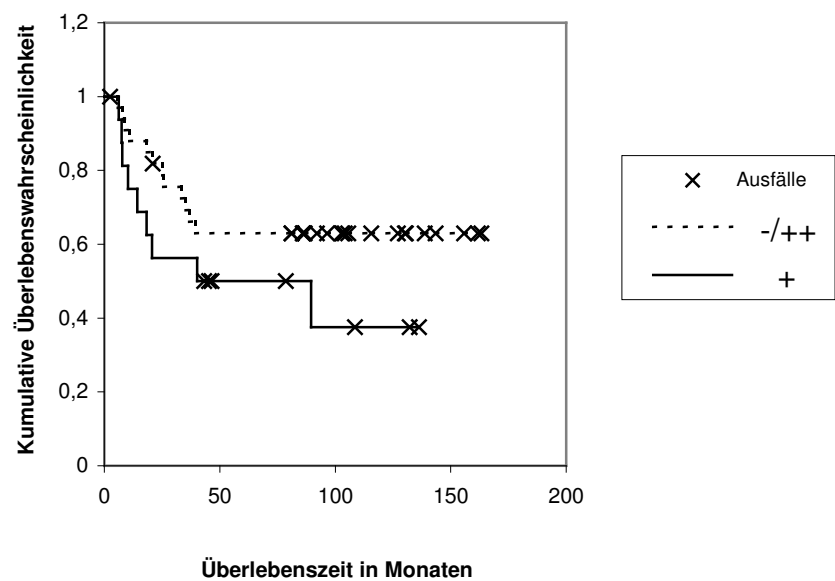


Abb. 11: Kaplan-Meier-Analyse gruppiert nach Proliferationsraten -/+ vs. +

Unter den N-Myc-amplifizierten Patienten überlebt in der Gruppe derer mit schwach positiver Proliferation kein Patient. Von denen mit einer stark positiven Proliferation überleben nur 37,5%, von denen ohne erkennbare Proliferationsrate 50%. Unter den nicht amplifizierten Patienten ist die Überlebensrate derer mit schwach positiver Proliferation prozentual ebenfalls die geringste (61,5%). Patienten ohne erkennbare Proliferation überleben zu 66,7%, solche mit starker Proliferation dagegen zu 100%.

Die Überlebensraten in Abhängigkeit der N-Myc-Amplifikation und der Proliferationsrate sind in Abb. 12 dargestellt.

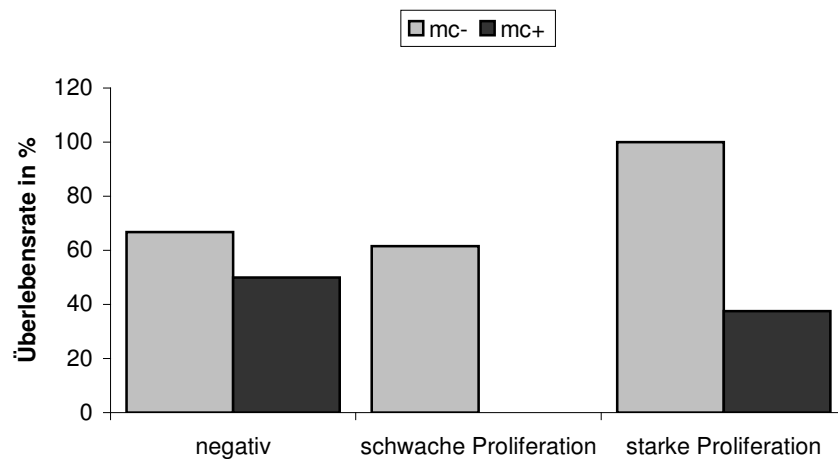


Abb. 12: Überlebensrate in Prozent in Abhängigkeit der N-Myc-Amplifikation und der Proliferationsrate

3.4. Apoptose

Die Untersuchung der Apoptoseraten und die Kategorisierung in negative (-, <5%), schwach positive (+, 5-15%) und stark positive Apoptose (++, >15%) erfolgte mittels Immunfluoreszenzmikroskopie TUNEL-gefärbter Primärtumorschnitte (vgl. S. 38).

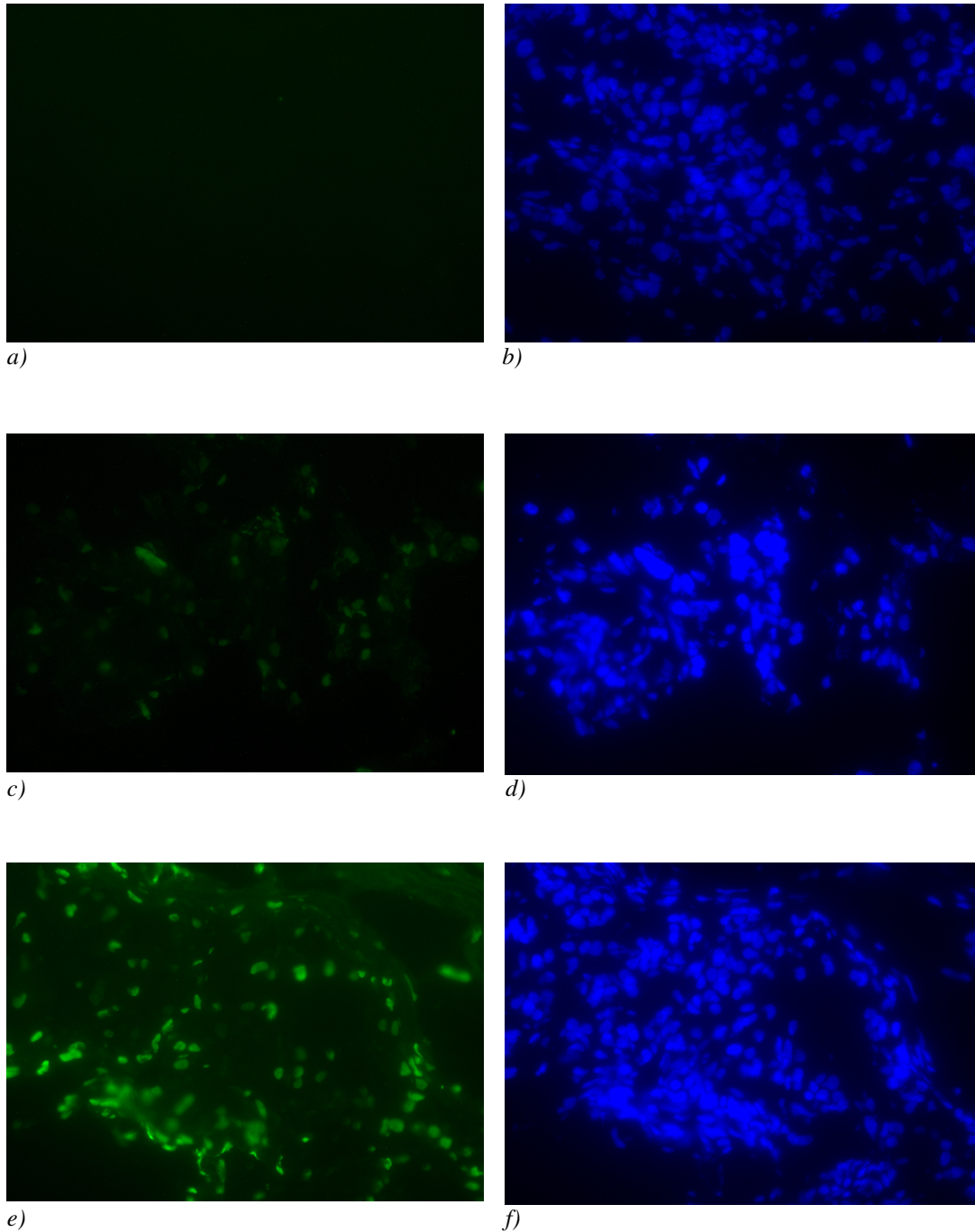


Abb. 13: Repräsentative Bilder der TUNEL-Färbungen (links) und den dazugehörigen DAPI-gefärbten Arealen; oben negative Apoptose (a/b), mittig schwache Apoptose (c/d), unten starke Apoptose (e/f)

In der untersuchten Gruppe ist die schwach positive Apoptose mit 42% am stärksten vertreten. Negative Apoptose findet sich zu 34%, stark positive zu 24%.

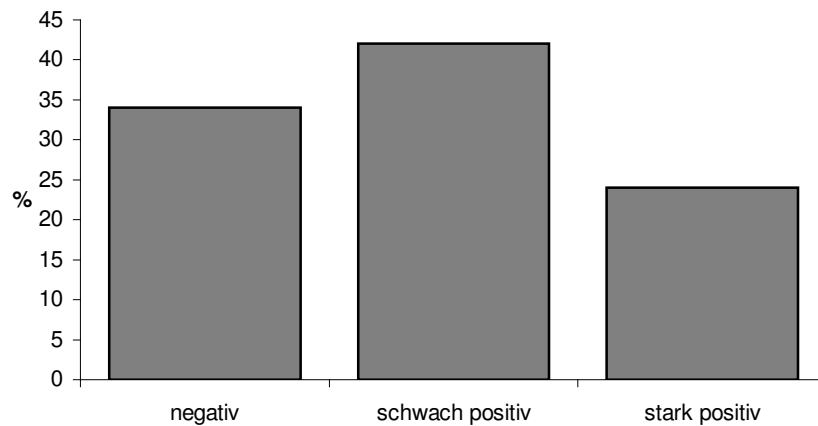


Abb. 14: Apoptoseraten

Im Vergleich der N-Myc-amplifizierten mit den nicht amplifizierten Tumoren ist festzustellen, dass die amplifizierten Tumoren weit häufiger starke Apoptose (31,25%) aufweisen als die nichtamplifizierten (20,59%) und stattdessen sowohl weniger negative (31,25%) als auch schwach positive Apoptose (37,5%) als die nichtamplifizierten zeigen (-: 35,29%, +: 44,12%). Es ist also eine Verstärkung der Apoptose unter N-Myc-Amplifikation zu beobachten (s. Abb. 15).

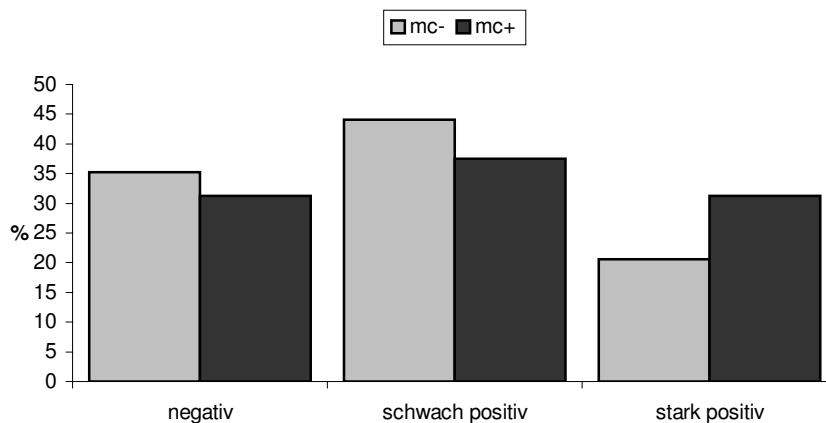


Abb. 15: Apoptoseraten in Abhängigkeit der N-Myc-Amplifikation

Im Vergleich der langzeitüberlebenden (lts) mit den verstorbenen Patienten (ns) findet sich dagegen eine andere Verteilung der Apoptoseraten. Während die lts-Patienten vorwiegend schwach positive Apoptose aufweisen (55,17%), negative (24,14%) und stark positive Apoptose (20,69%) dagegen relativ selten vorkommen ist bei den ns-Patienten wesentlich häufiger eine negative (47,62%) und eine stark positive

Apoptose (28,57%) vorzufinden, schwach positive (23,81%) dagegen selten (s. Abb. 16).

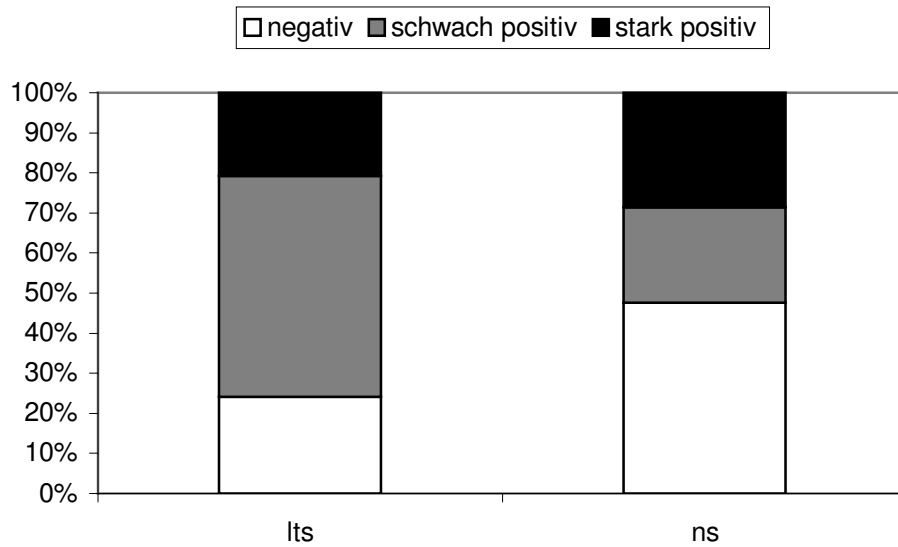


Abb. 16: Apoptoseraten in Abhängigkeit des Überlebens

Hinsichtlich der kumulativen Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit von der Apoptoserate ergibt sich nach Kaplan-Meier-Analyse, dass Patienten mit sowohl einer negativen aber auch einer stark positiven Apoptoserate eine tendenziell schlechtere Überlebenswahrscheinlichkeit aufweisen, als solche mit schwach positiver Apoptose ($p = 0,123592$):

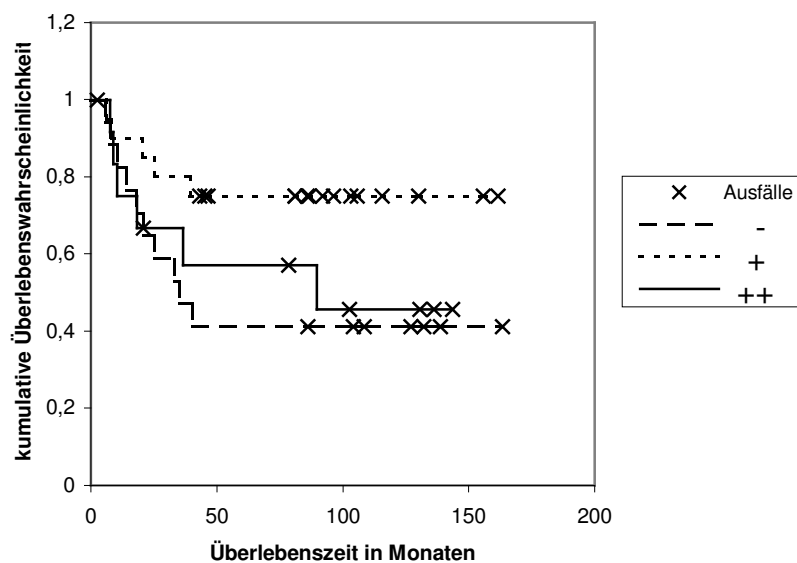


Abb. 17: Kaplan-Meier-Analyse gruppiert nach Apoptoserate

Negative und schwach positive Apoptose gegen stark positive ergibt mit $p = 0,518098$ keine signifikant bessere, stattdessen eher eine schlechtere Überlebenswahrscheinlichkeit für die stark positive Apoptose (Abb. 18). Beim Vergleich negativer gegen schwach und stark positiver Apoptose zusammen ergibt sich mit $p = 0,118659$ eine tendenziell schlechtere, aber ebenfalls nicht signifikant schlechtere Prognose bei negativer Apoptose (Abb. 19).

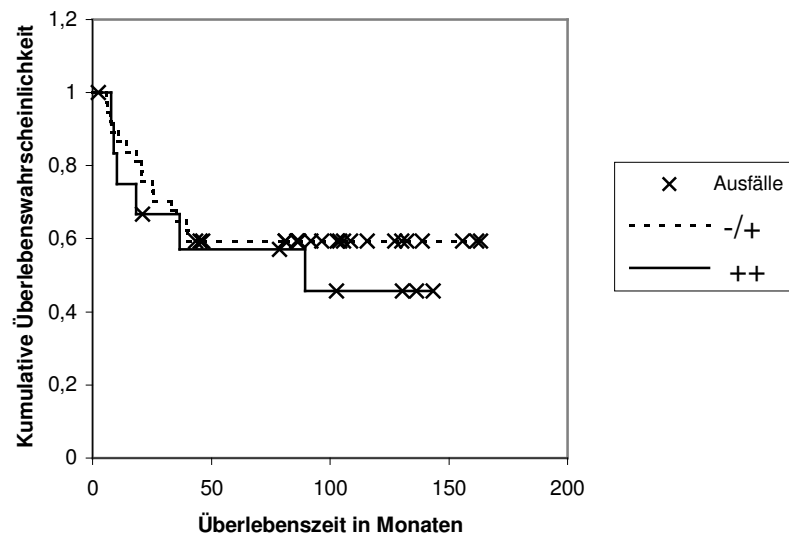


Abb. 18: Kaplan-Meier-Analyse gruppiert nach Apoptoserate -/+ vs. ++

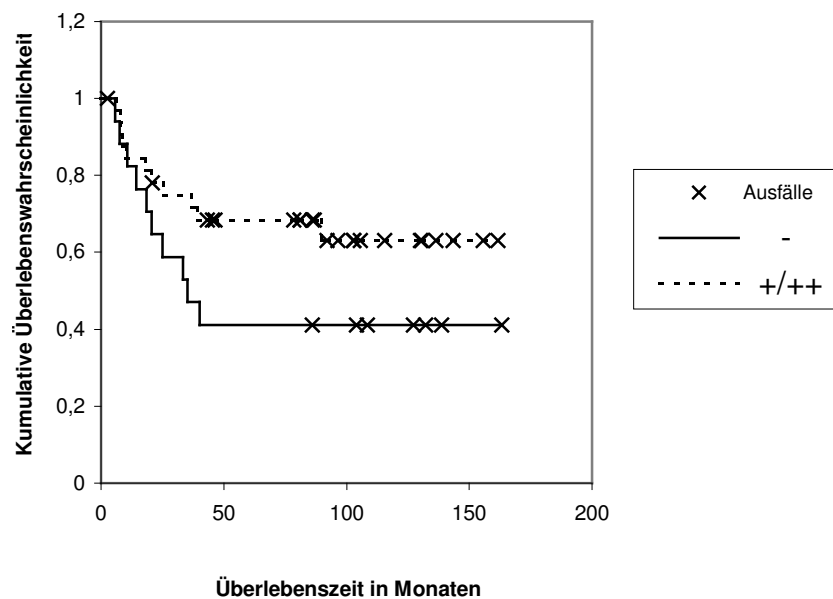


Abb. 19: Kaplan-Meier-Analyse gruppiert nach Apoptoserate - vs. +/++

Vergleicht man negative und stark positive Apoptose zusammen mit schwach positiver Apoptose, ergibt sich mit $p = 0,044859$ nach Kaplan-Meier-Analyse eine signifikant bessere Überlebenswahrscheinlichkeit für die schwach positive Apoptose (Abb. 20):

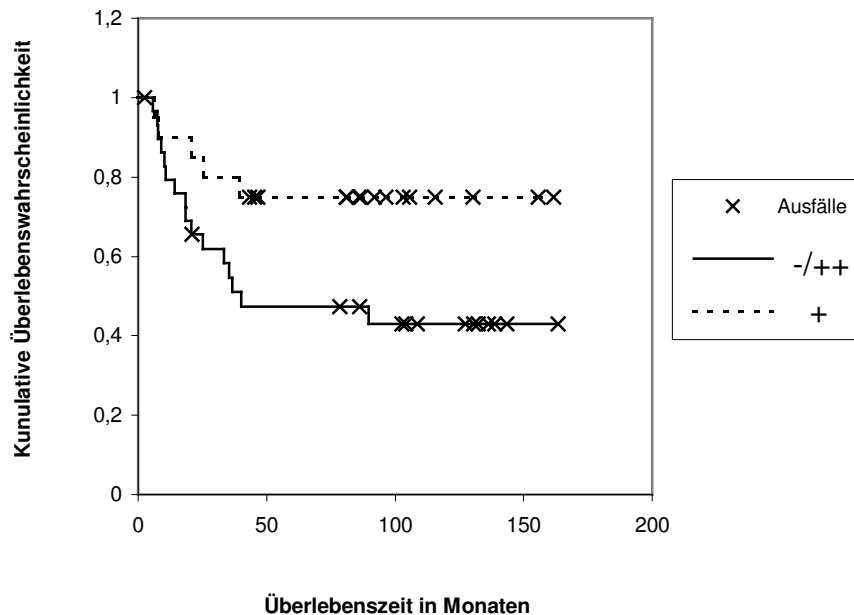


Abb. 20: Kaplan-Meier-Analyse gruppiert nach Apoptoserate -/++ vs. +

Unter den N-Myc-amplifizierten Patienten überleben in der Gruppe derer mit schwach positiver Apoptose mit 66,7% die meisten. Von denen mit einer stark positiven Apoptose überleben nur 20%, von denen ohne erkennbare Apoptose 0%. Unter den nicht amplifizierten Patienten bringt das vollständige Fehlen der Apoptose ebenfalls die schlechteste Überlebensrate (58,3%) mit sich, gefolgt von der stark positiven (71,4%). Auch hier überleben solche mit schwach positiver Apoptose am meisten (80%).

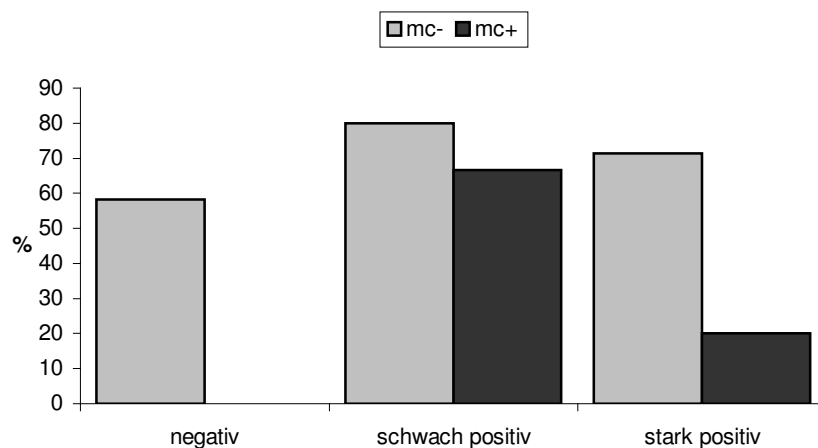


Abb. 21: Überlebensrate in Abhängigkeit der N-Myc-Amplifikation und der Apoptoserate

4. Diskussion

4.1. N-Myc und Proliferation

In Übereinstimmung mit der erstmalig 1985 durch Seeger et al. gewonnenen Erkenntnis haben von den untersuchten Proben die N-Myc-amplifizierten Tumoren eine signifikant schlechtere Prognose als die nicht amplifizierten (s. Abb. 3) (Seeger et al., 1985). Wie genau die N-Myc-Amplifikation zu einem wesentlich aggressiveren Wachstumsverhalten beiträgt, ist noch nicht vollständig geklärt. Vorliegende Arbeit geht der naheliegenden Vermutung nach, ob im Neuroblastom die generelle Verstärkung der Proliferation maßgeblicher Wirkmechanismus sein kann. Schließlich ist eine erhöhte Proliferation in vielen Tumorsystemen mit rascher Tumorprogression und somit schlechter Prognose vergesellschaftet (zur Übersicht siehe Robbins et al., 1987). Auch für das Neuroblastom ist ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer erhöhten Proliferationsrate der Tumore und schlechter Prognose der betroffenen Patienten bereits beschrieben (Keim et al., 1993; Kawasaki et al., 1995).

Die dokumentierten Einflussmöglichkeiten von Myc auf die Proliferation sind dabei äußerst vielgestaltig. So kontrolliert es sie durch direkte transkriptionelle Aktivierung respektive Repression verschiedener Zellzyklus-regulatorisch wirkender Proteine, wie beispielsweise Cdc25A, die Cykline D1, D2, E und A, die Cyklin-abhängigen Kinasen CDK1, -2 und -4 sowie E2F (Born et al., 1994; Kim et al., 1994; Beier et al., 2000). Es fördert das Zellwachstum weiterhin durch Transkriptionssuppression antiproliferatorischer Gene, wie das durch DNA-Schaden induzierbare Gen Gadd45, Gadd153 und der CKI-Gene p15, p21 und p27 (Dang, 1999; Grandori et al., 2000). Über eine Aktivierung des Myc-Gens ist es möglich, in ruhenden Zellen den Zellzyklus wieder in Gang zu setzen und eine Zellzyklusprogression voranzutreiben (Eilers et al., 1991; Lutz et al., 1996). Myc spielt eine entscheidende Rolle beim Übergang von der G0- bis hin zur S-Phase (Spencer & Groudine, 1991). Es ist ein „early response“-Gen, das auf mitogene Stimuli sofort reagiert und die Zelle in die G1-Phase treibt (Heikkilä et al., 1987; de Alboran et al., 2001). Myc aktiviert den CyklinE-CDK2-Komplex am Übergang der G1- zur S-Phase (Berns et al., 1997; Müller et al., 1997; Peresz-Roger et al., 1997; Steiner et al., 1995; Vlach et al., 1996; Bouchard et al., 1998). In ruhenden Zellen liegen die CyklinE-CDK2-Komplexe gebunden an das Zellzyklus-inhibitorische Protein p27Kip1 vor. In diesem ternären Komplex ist die Wirkung von Cyklin E inhibiert. Myc bewirkt zum einen durch direkte transkriptionelle Aktivierung, zum

anderen durch Sequestrierung von p27Kip1 an Cyklin D2 einen Anstieg der freien, also nicht an p27Kip1 gebundenen Form von Cyklin E (Vlach et al., 1996; Bouchard et al., 1998; Peresz-Roger et al., 1997). Neben einer Beeinflussung der CyklinE-CDK2-Komplexe führt eine Induktion von Myc auch zu einem Anstieg der D-Typ Cyklin-abhängigen Kinaseaktivität. Mikroinjektion von gegen Cyklin D1 gerichteten Antikörpern bewirkte auch in einem aktivierten Myc-ER-System eine Inhibierung der Zellzyklus-Progression (Steiner et al., 1995). In Übereinstimmung hiermit sind aktive G1- Cyklin/CDK-Komplexe notwendig und auch hinreichend für eine Induktion von Cyklin A durch Myc (Rudolph et al., 1996). Die Expression von Myc wird über den ganzen Zellzyklus hinweg aufrechterhalten, es wird ihm auch eine Rolle in der G2-Phase zugeschrieben (Hann et al., 1985; Mateyak et al., 1997).

Auch die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse bestätigen die für Myc dargelegte Verstärkung der Proliferation. Es ist eine deutlich stärkere Proliferation (s. Abb. 6) der N-Myc-amplifizierten Patienten im Vergleich zu den nicht amplifizierten zu beobachten, wobei N-Myc die Proliferation generell hin zur stark positiven Ausprägung verlagert zulasten der negativen und schwach positiven.

Der zu erwartende Zusammenhang von starker Proliferation und schlechter Prognose kann jedoch nicht bestätigt werden. Es zeigt sich stattdessen, dass Patienten mit einer stark positiven Proliferation eine tendenziell bessere Prognose aufweisen als solche mit einer schwach positiven. Gleichfalls bietet eine negative Proliferation eine bessere Prognose (s. Abb. 7 u. 8) als eine schwach positive. Beim „nonlinearen“ Vergleich, also dem Vergleich der schwach positiven Proliferation mit beiden anderen Proliferationsraten mittels Kaplan-Meier-Analyse (-/++ vs. +, s. Abb. 11), ergibt sich mit $p = 0,14$ ein deutlicherer, allerdings nicht signifikanter Unterschied hinsichtlich der Prognose als bei linearer Auswertung (-/+ vs. ++, $p = 0,42$; - vs +/++, $p = 0,56$) (s. Abb. 9 u. 10), so dass die schlechteste Prognose bei einem schwach positiven Proliferationsniveau vermutet werden kann. Tatsächlich haben sowohl bei den N-Myc-amplifizierten als auch bei den nicht amplifizierten die Patienten mit schwach positiver Proliferation die geringste Überlebensrate (s. Abb. 12). Die nicht amplifizierten weisen lediglich deutlich günstigere Absolutwerte auf. N-Myc jedoch steigert das Proliferationsniveau praktisch linear und unidirektional hin zu einer stark positiven Proliferation, und zwar zulasten der schwach positiven (s. Abb. 6). Der schlecht

prognostische Einfluss von N-Myc kann somit möglicherweise nicht über die Steigerung der Proliferation erklärt werden.

4.2. N-Myc und Apoptose

Als zweites, die Proliferation antagonisierendes Phänomen ist die Apoptose untersucht und ihre Auswirkung auf die Prognose evaluiert worden. Der genaue Mechanismus einer Myc-induzierten Apoptose ist bislang ebenfalls noch nicht eindeutig geklärt, bisherige Erkenntnisse präsentieren sich aber wie auch bei der Proliferation vielgestaltig. Unumstritten scheint die komplexe Interaktion des Myc-Gens mit Mechanismen der Apoptoseinduktion zu sein. Neben einer direkten Apoptoseauslösung wirkt Myc für unterschiedliche die Zellintegrität schädigende Stimuli als Apoptose-sensibilisierend (Evan & Littlewood, 1998). Sowohl Über- als auch Unterexpression von Myc kann zur Apoptose führen (Conzen et al., 2000; Thompson, 1998). Verschiedene zellzyklusfördernde Komponenten, wie Cyklin A und Cdc25A, wurden bei erhöhter c-Myc-Expression mit dem Zelltod in Verbindung gebracht (Hoang et al., 1994; Galaktionov et al., 1996). Ein weiteres durch c-Myc stimuliertes Targetgen ist die Ornithin-Decarboxylase (ODC), die bei Überexpression Apoptose verursachen kann (Packham & Cleveland, 1994; Packham & Cleveland, 1995). Weiterhin transaktiviert c-Myc den p53-Promotor und erhöht die Halbwertszeit von p53 (Reisman et al., 1993; Hermeking & Eick, 1994). Eine starke Anwesenheit von p53 scheint aber für c-Myc-induzierte Apoptose nicht notwendig zu sein (Hsu et al., 1995; Sakamuro et al., 1995). Dagegen korreliert sie mit Fas-Ligand- und Fas-Rezeptor-Expression (Wang et al., 1998). Ausschüttung von Cytochrom c durch c-Myc involviert aktives Bax, welches durch c-Myc reguliert zu sein scheint (Duelli & Lazebnik, 2000; Mitchell et al., 2000; Soucie et al., 2001). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass für eine effiziente Apoptoseinduktion über c-Myc eine Oberflächeninteraktion zwischen CD95-Ligand und seinem Rezeptor benötigt wird (Hueber et al., 1997). Andererseits wurden auch Faktoren beschrieben, die an einer Hemmung c-Myc-induzierter Apoptose beteiligt sind. c-Myc-induzierte Apoptose kann supprimiert werden über Zytokine wie IGF1 (Harrington et al., 1994; Hueber et al., 1997) oder Antiapoptoseproteine wie z.B. bcl-2 (Bissonnette et al., 1992; Fanidi et al., 1992; Hueber et al., 1997). Direkt in die Apoptose-Induktion ist Myc über die transkriptionelle Aktivierung von p19ARF involviert (Zindy et al., 1998; Dang, 1999). p19ARF interagiert und reguliert den Komplex aus p53 und dessen E3-Ligase Mdm-2 und führt hierüber zu einer

Stabilisierung von p53 (Sherr, 1998). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass ARF Myc direkt bindet, dass es an Myc-abhängige Promotoren rekrutiert wird und dass es Myc-abhängige Transaktivierung hemmt, nicht aber Repression (Qi et al., 2004; Datta et al., 2004). Überexpression von Myc führt zur Relokalisation von ARF aus dem Nukleolus ins Nukleoplasma, umgekehrt kann ARF Myc in den Nukleolus relokalisieren. Weiterhin determiniert Myc über die Inhibierung von NF- κ B und Jnk die zytotoxische Wirkung von TNF α (Janicke et al., 1994; Klefstrom et al., 1997). Entsprechend ist der CD95/Fas-Ligand nur in Gegenwart von Myc in der Lage, in Rat-1 Fibroblasten Apoptose zu induzieren (Hueber et al., 1997). Ferner ist für Myc eine Steigerung der Kaspase-9-Aktivität gezeigt (Fearhead et al., 1997). Schließlich interagiert Myc über seine N-terminale Domäne mit dem Adaptor-Protein Bin-1, das in einigen Tumorzellen über einen weitgehend Caspase-unabhängigen Mechanismus zu Chromatinveränderungen und DNA-Degradation führt (Elliot et al., 1999). Eine N-Myc induzierte Apoptose fand man sowohl in Neuroblastomzellen als auch im hepatozellulären Karzinom (Galderisi et al., 1999; Ueda & Ganem, 1996).

Auch im untersuchten Patientenkollektiv konnte bei N-Myc-amplifizierten Patienten eine tendenziell stärkere Apoptose als bei nicht amplifizierten Patienten gefunden werden (s. Abb. 15). Es findet sich wiederum eine lineare unidirektionale Verstärkung hin zu stark positiver Apoptose zulasten der negativen und schwach positiven Apoptose. Das schlecht prognostische N-Myc verstärkt also mit der Apoptose einen eigentlich als gut prognostisch anzunehmenden Mechanismus. Dabei wäre doch zu erwarten, dass die Prognose umso besser wird, je stärker der programmierte Zelltod in einem Tumorgeschehen ausgeprägt ist. Diese Vermutung kann durch die gewonnenen Ergebnisse jedoch nicht bestätigt werden.

Es zeigt sich stattdessen, dass Patienten mit einer schwach positiven Apoptose eine bessere Prognose aufweisen als solche mit einer stark positiven sowie einer negativen Apoptose (s. Abb. 16 u. 17). Es ergibt sich bei nonlinearer Kaplan-Meier-Analyse eine signifikant bessere Überlebenswahrscheinlichkeit für die schwach positive Apoptose (+ vs. -/++, $p = 0,045$) (s. Abb. 20). Für die stark positive Apoptose ist bei linearer Auswertung (-/+ vs. ++, $p = 0,52$) (s. Abb. 18) keine signifikant bessere, sondern eher eine geringgradig schlechtere Prognose auszumachen. Insbesondere für die negative Apoptose, die bei N-Myc-Amplifikation seltener auftritt (- vs. +/++, $p = 0,12$)

(s. Abb. 19), findet sich eine tendenziell schlechtere Überlebenswahrscheinlichkeit (s. auch Abb. 17). Tatsächlich haben sowohl bei den N-Myc-amplifizierten als auch bei den nicht amplifizierten die Patienten mit schwach positiver Apoptose die besten Überlebensraten, die schlechtesten dagegen bei fehlender Apoptose, die unter N-Myc-Amplifikation wie beschrieben seltener auftritt (s. Abb. 21). Der schlecht prognostische Einfluss von N-Myc kann also wahrscheinlich auch nicht über seine die Apoptose steigernde Wirkung erklärt werden.

4.3. Modell zum prognostischen Einfluss von Proliferation und Apoptose

Zusammenfassend lässt sich also die Hypothese ableiten, dass im Vergleich mit den jeweiligen Extremen bei einer schwach positiven Apoptose die beste, bei einer schwach positiven Proliferation die schlechteste Prognose zu finden ist. Bei stärkerer oder schwächerer Apoptose verschlechtert sich die Prognose, bei stärkerer oder schwächerer Proliferation verbessert sie sich. Diese Überlegungen führen zu folgendem Modell:

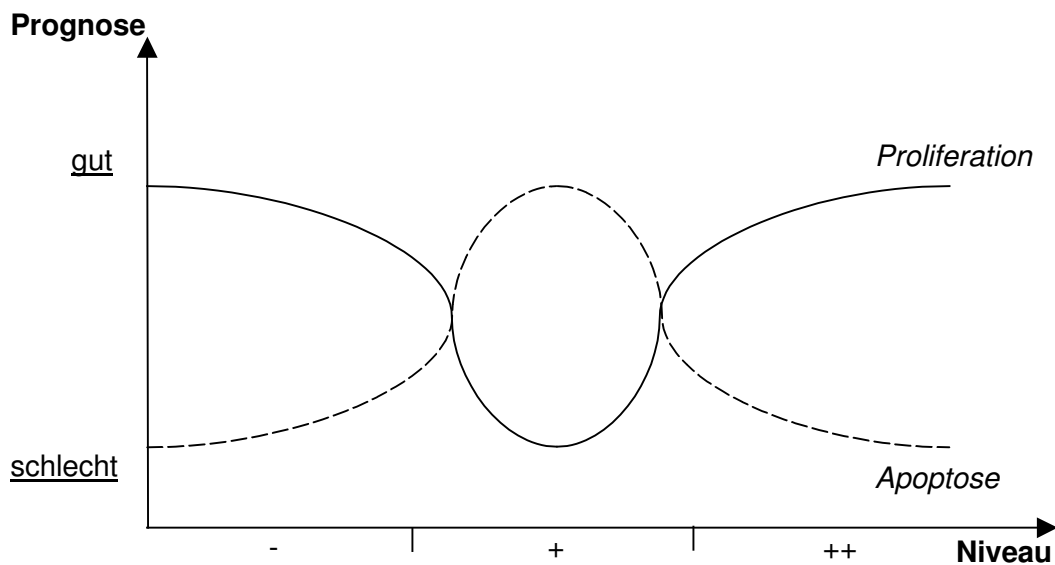


Abb. 22: Hypothetisches Modell zum prognostischen Einfluss der verschiedenen Proliferations- bzw. Apoptoseraten

Die durch Myc beeinflussbaren Systeme sind zahlreich und in ihrer Komplexität kaum überschaubar. Für ein malignes, aggressives und schlecht prognostisches Wachstumsverhalten bedarf es neben einer erhöhten Proliferationsrate auch anderer Eigenschaften, wie etwa der Immortalisierung, der Entdifferenzierung, der Fähigkeit zu invasivem und destruierendem Wachstum oder der Fähigkeit zur Neoangiogenese. Für

Myc ist nachgewiesen, dass es auch eben diese Mechanismen beeinflussen kann, und damit als wesentlicher Transformationsfaktor fungiert. In Kooperation mit einem zweiten Onkogen, wie beispielsweise „activated ras“, kann Myc primäre und etablierte Zelllinien transformieren (Land et al., 1983; Ruley, 1990). Die durch Myc aktivierte Ornithin-Decarboxylase kann unter Überexpressionsbedingungen NIH3T3 Zellen transformieren (Auvinen et al., 1992; Moshier et al., 1993). Ein weiteres durch Myc reguliertes Gen ist die katalytische Untereinheit des Enzyms Telomerase hEST2/TERT (Wang et al., 1998; Greenberg et al., 1999). Telomeraseaktivität, die im humanen Neuroblastom wie beschrieben stark mit N-Myc-Amplifikation korreliert, ist assoziiert mit zellulärer Immortalisierung und ist neben einer negativen Regulation von p53 und pRb notwendig, humane Zellen zu transformieren (Hahn et al., 1999). Ein weiterer für die transformierende Wirkung von Myc wahrscheinlich wesentlicher Mechanismus ist die transkriptionelle Repression von Genen. Beispiele für Gene, deren Transkription von Myc reprimiert werden und die für die maligne Transformation von Zellen und somit letztlich in der Tumorigenese eine wichtige Rolle spielen, sind Zell-Adhäsionsgene (LFA-1, α 3 β 1) (Inghirami et al., 1990), Zellzyklus/Wachstumsarrest-Gene (Gadd34, Gadd45, Gadd 153, gas1, p27Kip1, miz-1) (Chen et al., 1996; Amundson et al., 1998; Staller et al., 2001) oder differenzierungsspezifische Gene (C/EBP α , mim-1, lysozyme) (Li et al., 1994; Mink et al., 1996). Eine verminderte N-Myc-Expression geht einer Differenzierung humaner Neuroblastomzellen voraus (Thiele et al., 1985). Kürzlich wurde von Kang et al. weiterhin eine Verbindung zwischen N-Myc und dem „*vascular endothelial growth factor*“ (VEGF), der mit verstärkter Angiogenese und schlechterer Prognose assoziiert ist, beschrieben (Kang et al., 2008); mittels Transfektion von gegen N-Myc gerichteter siRNA in eine Neuroblastomzelllinie konnten sie die VEGF-Sekretion reduzieren. Indirekt trägt Myc ferner über seine starke Korrelation mit der schlecht prognostischen TrkB-Rezeptorexpression zur verstärkten Angiogenese und Therapeutikaresistenz bei (Brodeur, 2003). Für den BDNF-TrkB-Pfad konnte gezeigt werden, dass er ebenfalls eine verstärkte VEGF-Expression induziert (Nakamura et al., 2006). Des Weiteren besteht auch ein Zusammenhang zwischen N-Myc und der Expression der „*focal adhesion kinase*“ (FAK), einer zytoplasmatischen Tyrosinkinase, für die gezeigt ist, dass sie in diversen Tumorentitäten verstärkt exprimiert wird und als Überlebensfaktor fungiert. Beierle et al. wiesen nach, dass N-Myc die FAK-Expression induziert (Beierle et al., 2007). Darüber hinaus vermittelt der Myc-Kofaktor TRRAP die Bindung an

Histonacetyltransferasen, wodurch Myc Histonmodifikationen nicht nur an bestimmten Targetgenen, sondern im gesamten Genom beeinflusst (Knoepfler et al., 2006). Schließlich sind noch Mechanismen zu vermuten, die vom transkriptionellen Wirken des N-Myc-Proteins unabhängig sind und stattdessen nur auf der Amplifikation selbst beruhen. So konnten Cohn et al. zeigen, dass hohe Spiegel an exprimierter N-Myc-RNA bei fehlender N-Myc-Amplifikation nicht prognostisch für einen ungünstigen Krankheitsverlauf bei Patienten mit Neuroblastomen in fortgeschrittenen Stadien sind (Cohn et al., 2000).

Im Neuroblastom geht eine N-Myc-Amplifikation unstrittig mit einer schlechteren Prognose einher. Die dabei wirksamen Mechanismen sind, wie dargelegt, unzweifelhaft vielfältig, in ihrer Summe aber führen sie zu einem aggressiveren Wachstumsverhalten des Tumors. Über eine bloße Verstärkung der Proliferation kann dies jedoch nach den vorliegenden Ergebnissen nicht erklärt werden. Es ist also zu vermuten, dass N-Myc parallel zur Proliferation auch andere gutprognostische Prozesse verstärkt bzw. schlechtprognostische abschwächt, sodass in der Summe betrachtet eine stark positive Proliferation mit einer besseren Prognose einhergehen kann als eine schwach positive. Auf der anderen Seite könnte N-Mycs Verstärkung der Apoptose durch parallel ablaufende, die Prognose verschlechternde, Mechanismen überkompensiert werden. Welche Myc-responsiven Systeme letztendlich zum Tragen kommen, könnte durch die komplexe Interaktion zelltypspezifischer Einflussfaktoren sowie Umgebungsfaktoren, wie beispielsweise den mit den Trk-Rezeptoren assoziierten Neurotrophenen, beeinflusst werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf eine nonlineare Beziehung zwischen Proliferations-/Apoptoseniveau und Prognose im humanen Neuroblastom hin. Auch das spiegelbildliche Verhalten von Proliferation und Apoptose legt diesen Zusammenhang nahe, die unabhängig voneinander erhobenen Beobachtungen beider Phänomene untermauern sich gegenseitig. Sollten sie sich bestätigen, könnten auch andere Tumorsysteme auf nonlineare Zusammenhänge hin überprüft werden. Zwar sind die Targetgene von Myc von Zelltyp zu Zelltyp unterschiedlich, die biochemischen Mechanismen dagegen relativ konstant, sodass die Wirkung von Myc vielleicht auch in anderen Tumorentitäten mit der im Neuroblastom vergleichbar ist. Auf Grundlage obiger und zukünftiger Beobachtungen wäre schließlich zu erwägen, ob Proliferation

und Apoptose als Prognosekriterien Einzug in den klinischen Alltag erhalten könnten. Durch Etablierung geeigneter klinischer Methodik könnten Apoptose- und Proliferationsmessung neben N-Myc-Amplifikation, Patientenalter und klinischem Stadium ergänzende Prognostika für das Neuroblastom werden. In Zusammenschau aller dann eventuell verfügbaren Kriterien könnte so die Prognosestellung für Neuroblastompatienten weiter verbessert werden.

5. Zusammenfassung

Das Neuroblastom ist die dritthäufigste pädiatrische Malignomerkrankung nach den Leukämien/Lymphomen und Hirntumoren, die insbesondere durch ihre klare klinische Heterogenität imponiert. Während die meisten Patienten, insbesondere im Säuglingsalter, bei minimaler Therapie oder gar lediglich abwartender Beobachtung eine komplette Regression oder Ausreifung ihres Tumors in ein benignes Ganglioneurom erleben, versterben gerade die älteren Patienten (> 1 Jahr) häufig trotz maximaler multimodaler Therapie an den Folgen ihrer rasch metastasierenden Erkrankung. Als entscheidendes molekulares Prognosekriterium hat sich die Amplifikation des N-Myc-Genes etabliert. Kinder mit amplifiziertem N-Myc-Gen haben eine signifikant geringere Überlebenswahrscheinlichkeit als solche ohne. Unklar bleibt jedoch der genaue Mechanismus, über den N-Myc seinen Einfluss geltend macht.

Für N-Myc ist sowohl eine Steigerung der Proliferation als auch eine Steigerung der Apoptose beschrieben worden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es herauszufinden, ob es zwischen N-Myc-Amplifikation, Proliferations- und Apoptoserate sowie Prognose einen Zusammenhang gibt, beziehungsweise ob die Prognoseverschlechterung durch N-Myc-Amplifikation über ihre Wirkung auf Proliferation und Apoptose zu erklären ist.

Dazu wurde von 50 Primärtumorproben von Neuroblastompatienten das Proliferationsniveau per Cyklin A-Western Blot und das Apoptoseniveau per TUNEL-Immunfluoreszenzfärbung bestimmt und jeweils in negativ, schwach positiv und stark positiv gruppiert. Die gewonnenen Ergebnisse wurden mit der Amplifikation des N-Myc-Genes sowie dem klinischen Ausgang (Überleben/Versterben) korreliert.

Es zeigte sich, dass eine stark positive Proliferation keineswegs mit der schlechtesten Prognose einhergeht. Umgekehrt hatten Patienten mit stark positiver Apoptose nicht die beste Prognose. Stattdessen zeichnete sich ab, dass sich sowohl für die Proliferation als auch für die Apoptose mittlere Werte (schwach positiv) deutlich von den Extremen (negativ und stark positiv) abgrenzten. Patienten mit schwach positiver Proliferation wiesen eine tendenziell schlechtere, Patienten mit schwach positiver Apoptose die signifikant bessere Prognose auf. Dabei war es egal, ob es sich um N-Myc-amplifizierte oder nicht amplifizierte Tumoren handelte. Die nicht amplifizierten Tumoren wiesen hinsichtlich der Überlebenswahrscheinlichkeit lediglich günstigere Absolutwerte auf.

Für die N-Myc-Amplifikation konnte für die untersuchten Tumoren dagegen gezeigt werden, dass sie sowohl Proliferation als auch Apoptose verstärkt und zwar jeweils hin zur stark positiven Ausprägung je zulasten der negativen und schwach positiven.

Auf Grundlage dieser Beobachtungen wurde die Hypothese gestellt, dass der prognoseverschlechternde Einfluss der N-Myc-Amplifikation nicht allein auf seinen proliferationssteigernden Effekt zurückzuführen ist. Auch ihre Wirkung auf die Apoptose vermag die schlechte Prognose nicht hinreichend zu erklären. Stattdessen wird davon ausgegangen, dass Myc, ein Gen, für das eine Einflussnahme auf nahezu alle zellulären Prozesse vermutet werden kann, parallel gut- als auch schlechtprognostische Mechanismen beeinflusst. So könnten bei einer Wirksamkeit von Myc, die zu einer starken Proliferation führt, gleichzeitig gutprognostische Mechanismen zum Tragen kommen, die die Proliferation als an sich malignes Merkmal überkompensieren. Umgekehrt könnten bei starker Apoptose schlecht prognostische Mechanismen aktiviert werden. Schließlich ist für Malignität neben der Proliferation beispielsweise auch die Entdifferenzierung oder die Fähigkeit zu infiltrativem Wachstum, die beide ebenfalls von Myc beeinflusst werden, von entscheidender Bedeutung.

6. Literaturverzeichnis

[Acheson A, Conover JC, Fandl JP, DeChiara TM, Russell M, Thadani A, Squinto SP, Yancopoulos GD, Lindsay RM.](#) A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death. *Nature*. 1995 Mar 30;374(6521):450-3.

[Ambros IM, Zellner A, Roald B, Amann G, Ladenstein R, Printz D, Gadner H, Ambros PF.](#) Role of ploidy, chromosome 1p, and Schwann cells in the maturation of neuroblastoma. *N Engl J Med*. 1996 Jun 6;334(23):1505-11.

[Amundson SA, Zhan Q, Penn LZ, Fornace AJ Jr.](#) Myc suppresses induction of the growth arrest genes gadd34, gadd45, and gadd153 by DNA-damaging agents. *Oncogene*. 1998 Oct 29;17(17):2149-54.

[Askew DS, Ashmun RA, Simmons BC, Cleveland JL.](#) Constitutive c-myc expression in an IL-3-dependent myeloid cell line suppresses cell cycle arrest and accelerates apoptosis. *Oncogene*. 1991 Oct;6(10):1915-22.

[Auvinen M, Paasinen A, Andersson LC, Holtta E.](#) Ornithine decarboxylase activity is critical for cell transformation. *Nature*. 1992 Nov 26;360(6402):355-8.

[Baldin V, Lukas J, Marcote MJ, Pagano M, Draetta G.](#) Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev*. 1993 May;7(5):812-21.

[Baserga R, Porcu P, Sell C.](#) Oncogenes, growth factors and control of the cell cycle. *Cancer Surv*. 1993;16:201-13. Review.

[Baudino TA, Cleveland JL.](#) The Max network gone mad. *Mol Cell Biol*. 2001 Feb;21(3):691-702. Review.

[Beier R, Burgin A, Kiermaier A, Fero M, Karsunky H, Saffrich R, Moroy T, Ansorge W, Roberts J, Eilers M.](#) Induction of cyclin E-cdk2 kinase activity, E2F-dependent transcription and cell growth by Myc are genetically separable events. *EMBO J*. 2000 Nov 1;19(21):5813-23.

[Beierle EA, Trujillo A, Nagaram A, Kurenova EV, Finch R, Ma X, Vella J, Cance WG, Golubovskaya VM.](#) N-MYC regulates focal adhesion kinase expression in human neuroblastoma. *J Biol Chem*. 2007 Apr 27;282(17):12503-16. Epub 2007 Feb 27.

[Berberich S, Hyde-DeRuyscher N, Espenshade P, Cole M.](#) max encodes a sequence-specific DNA-binding protein and is not regulated by serum growth factors. *Oncogene*. 1992 Apr;7(4):775-9.

[Berns K, Hijmans EM, Bernards R.](#) Repression of c-Myc responsive genes in cycling cells causes G1 arrest through reduction of cyclin E/CDK2 kinase activity. *Oncogene*. 1997 Sep;15(11):1347-56.

[Birrner MJ, Segal S, DeGreve JS, Kaye F, Sausville EA, Minna JD.](#) L-myc cooperates with ras to transform primary rat embryo fibroblasts. *Mol Cell Biol*. 1988 Jun;8(6):2668-73.

[Bissonnette RP, Echeverri F, Mahboubi A, Green DR.](#) Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2. *Nature*. 1992 Oct 8;359(6395):552-4.

[Blackwell TK, Huang J, Ma A, Kretzner L, Alt FW, Eisenman RN, Weintraub H.](#) Binding of myc proteins to canonical and noncanonical DNA sequences. *Mol Cell Biol*. 1993 Sep;13(9):5216-24.

[Blackwell TK, Kretzner L, Blackwood EM, Eisenman RN, Weintraub H.](#) Sequence-specific DNA binding by the c-Myc protein. *Science*. 1990 Nov 23;250(4984):1149-51.

[Blackwood EM, Eisenman RN.](#) Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science*. 1991 Mar 8;251(4998):1211-7.

[Blake MC, Azizkhan JC.](#) Transcription factor E2F is required for efficient expression of the hamster dihydrofolate reductase gene in vitro and in vivo. *Mol Cell Biol*. 1989 Nov;9(11):4994-5002.

[Blattner C, Sparks A, Lane D.](#) Transcription factor E2F-1 is upregulated in response to DNA damage in a manner analogous to that of p53. *Mol Cell Biol*. 1999 May;19(5):3704-13.

Böcker/Denk/Heitz – Pathologie, 3. Aufl, Kap. 40.7.1, Urban&Fischer 2004

[Bookstein R, Rio P, Madreperla SA, Hong F, Allred C, Grizzle WE, Lee WH.](#) Promoter deletion and loss of retinoblastoma gene expression in human prostate carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Oct;87(19):7762-6.

[Born TL, Frost JA, Schonthal A, Prendergast GC, Feramisco JR.](#) c-Myc cooperates with activated Ras to induce the cdc2 promoter. *Mol Cell Biol*. 1994 Sep;14(9):5710-8.

[Borriello A, Cucciolla V, Oliva A, Zappia V, Della Ragione F.](#) p27Kip1 metabolism: a fascinating labyrinth. *Cell Cycle*. 2007 May 2;6(9):1053-61. Epub 2007 May 13. Review.

[Botz J, Zerfass-Thome K, Spitkovsky D, Delius H, Vogt B, Eilers M, Hatzigeorgiou A, Jansen-Durr P.](#) Cell cycle regulation of the murine cyclin E gene depends on an E2F binding site in the promoter. *Mol Cell Biol*. 1996 Jul;16(7):3401-9.

[Bouchard C, Staller P, Eilers M.](#) Control of cell proliferation by Myc. *Trends Cell Biol*. 1998 May;8(5):202-6. Review.

[Bouchard C, Thieke K, Maier A, Saffrich R, Hanley-Hyde J, Ansorge W, Reed S, Sicinski P, Bartek J, Eilers M.](#) Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27. *EMBO J*. 1999 Oct 1;18(19):5321-33.

[Bourhis J, Benard J, Hartmann O, Boccon-Gibod L, Lemerle J, Riou G.](#) Correlation of MDR1 gene expression with chemotherapy in neuroblastoma. *J Natl Cancer Inst*. 1989 Sep 20;81(18):1401-5.

[Boyd KE, Farnham PJ.](#) Coexamination of site-specific transcription factor binding and promoter activity in living cells. *Mol Cell Biol*. 1999 Dec;19(12):8393-9.

[Boyd KE, Farnham PJ.](#) Myc versus USF: discrimination at the cad gene is determined by core promoter elements. *Mol Cell Biol*. 1997 May;17(5):2529-37.

[Bradshaw DM, Arceci RJ.](#) Clinical relevance of transmembrane drug efflux as a mechanism of multidrug resistance. *J Clin Oncol*. 1998 Nov;16(11):3674-90. Review.

[Brehm A, Miska EA, McCance DJ, Reid JL, Bannister AJ, Kouzarides T.](#) Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature*. 1998 Feb 5;391(6667):597-601.

[Brodeur GM.](#) Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer*. 2003 Mar;3(3):203-16. Review.

[Brodeur GM, Hayes FA, Green AA, Casper JT, Wasson J, Wallach S, Seeger RC.](#) Consistent N-myc copy number in simultaneous or consecutive neuroblastoma samples from sixty individual patients. *Cancer Res.* 1987 Aug 15;47(16):4248-53.

[Brodeur GM, Maris JM, Yamashiro DJ, Hogarty MD, White PS.](#) Biology and genetics of human neuroblastomas. *J Pediatr Hematol Oncol.* 1997 Mar-Apr;19(2):93-101. Review.

[Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, Carlsen NL, Castel V, Castelberry RP, De Bernardi B, Evans AE, Favrot M, Hedborg F, et al.](#) Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol.* 1993 Aug;11(8):1466-77. Review.

[Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, Varmus HE, Bishop JM.](#) Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science.* 1984 Jun 8;224(4653):1121-4.

[Brown CE, Howe L, Sousa K, Alley SC, Carrozza MJ, Tan S, Workman JL.](#) Recruitment of HAT complexes by direct activator interactions with the ATM-related Tra1 subunit. *Science.* 2001 Jun 22;292(5525):2333-7.

[Bush A, Mateyak M, Dugan K, Obaya A, Adachi S, Sedivy J, Cole M.](#) c-myc null cells misregulate cad and gadd45 but not other proposed c-Myc targets. *Genes Dev.* 1998 Dec 15;12(24):3797-802.

[Casaccia-Bonofil P, Gu C, Chao MV.](#) Neurotrophins in cell survival/death decisions. *Adv Exp Med Biol.* 1999;468:275-82. Review.

[Chan HS, Haddad G, Thorner PS, DeBoer G, Lin YP, Ondrusek N, Yeger H, Ling V.](#) P-glycoprotein expression as a predictor of the outcome of therapy for neuroblastoma. *N Engl J Med.* 1991 Dec 5;325(23):1608-14.

[Chan HM, Shikama N, La Thangue NB.](#) Control of gene expression and the cell cycle. *Essays Biochem.* 2001;37:87-96. Review.

[Chen C, Nussenzweig A, Guo M, Kim D, Li GC, Ling CC.](#) Down-regulation of gadd153 by c-myc in rat fibroblasts and its effect on cell growth and radiation-induced apoptosis. *Oncogene.* 1996 Oct 17;13(8):1659-65.

[Chen J, Jackson PK, Kirschner MW, Dutta A.](#) Separate domains of p21 involved in the inhibition of Cdk kinase and PCNA. *Nature.* 1995 Mar 23;374(6520):386-8.

[Cohn SL, London WB, Huang D, Katzenstein HM, Salwen HR, Reinhart T, Madafiglio J, Marshall GM, Norris MD, Haber M.](#) MYCN expression is not prognostic of adverse outcome in advanced-stage neuroblastoma with nonamplified MYCN. *J Clin Oncol.* 2000 Nov 1;18(21):3604-13.

[Cole MD.](#) The myc oncogene: its role in transformation and differentiation. *Annu Rev Genet.* 1986;20:361-84. Review.

[Conzen SD, Gottlob K, Kandel ES, Khanduri P, Wagner AJ, O'Leary M, Hay N.](#) Induction of cell cycle progression and acceleration of apoptosis are two separable functions of c-Myc: transrepression correlates with acceleration of apoptosis. *Mol Cell Biol.* 2000 Aug;20(16):6008-18.

[Corn PG, El-Deiry WS](#). Derangement of growth and differentiation control in oncogenesis. *Bioessays*. 2002 Jan;24(1):83-90. Review.

[Cowling VH, Chandriani S, Whitfield ML, Cole MD](#). A conserved Myc protein domain, MBIV, regulates DNA binding, apoptosis, transformation, and G2 arrest. *Mol Cell Biol*. 2006 Jun;26(11):4226-39. Erratum in: *Mol Cell Biol*. 2006 Jul;26(13):5201.

[Cowling VH, Cole MD](#). Mechanism of transcriptional activation by the Myc oncoproteins. *Semin Cancer Biol*. 2006 Aug;16(4):242-52. Epub 2006 Aug 4. Review.

[Dang CV](#). c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol Cell Biol*. 1999 Jan;19(1):1-11. Review.

[Datta A, Nag A, Pan W, Hay N, Gartel AL, Colamonici O, Mori Y, Raychaudhuri P](#). Myc-ARF (alternate reading frame) interaction inhibits the functions of Myc. *J Biol Chem*. 2004 Aug 27;279(35):36698-707. Epub 2004 Jun 15.

[de Alboran IM, O'Hagan RC, Gartner F, Malynn B, Davidson L, Rickert R, Rajewsky K, DePinho RA, Alt FW](#). Analysis of C-MYC function in normal cells via conditional gene-targeted mutation. *Immunity*. 2001 Jan;14(1):45-55.

[Dean M, Cleveland JL, Rapp UR, Ihle JN](#). Role of myc in the abrogation of IL3 dependence of myeloid FDC-P1 cells. *Oncogene Res*. 1987 Aug;1(3):279-96.

[Duelli DM, Lazebnik YA](#). Primary cells suppress oncogene-dependent apoptosis. *Nat Cell Biol*. 2000 Nov;2(11):859-62.

[Dulic V, Lees E, Reed SI](#). Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase. *Science*. 1992 Sep 25;257(5078):1958-61.

[Eggert A, Grotzer MA, Ikegaki N, Liu XG, Evans AE, Brodeur GM](#). Expression of neurotrophin receptor TrkA inhibits angiogenesis in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol*. 2000 Dec;35(6):569-72.

[Eilers M, Schirm S, Bishop JM](#). The MYC protein activates transcription of the alpha-prothymosin gene. *EMBO J*. 1991 Jan;10(1):133-41.

[el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B](#). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*. 1993 Nov 19;75(4):817-25.

[Elledge SJ, Harper JW](#). Cdk inhibitors: on the threshold of checkpoints and development. *Curr Opin Cell Biol*. 1994 Dec;6(6):847-52. Review.

[Elliott K, Sakamuro D, Basu A, Du W, Wunner W, Staller P, Gaubatz S, Zhang H, Prochownik E, Eilers M, Prendergast GC](#). Bin1 functionally interacts with Myc and inhibits cell proliferation via multiple mechanisms. *Oncogene*. 1999 Jun 17;18(24):3564-73.

[Evan G, Littlewood T](#). A matter of life and cell death. *Science*. 1998 Aug 28;281(5381):1317-22. Review.

[Evan GI, Wyllie AH, Gilbert CS, Littlewood TD, Land H, Brooks M, Waters CM, Penn LZ, Hancock DC](#). Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell*. 1992 Apr 3;69(1):119-28.

- [Evans GA, Farrar WL.](#) Retinoblastoma protein phosphorylation does not require activation of p34CDC2 protein kinase. *Biochem J.* 1992 Nov 1;287 (Pt 3):965-9.
- [Ewen ME, Sluss HK, Sherr CJ, Matsushime H, Kato J, Livingston DM.](#) Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins. *Cell.* 1993 May 7;73(3):487-97.
- [Fan G, Ma X, Kren BT, Steer CJ.](#) The retinoblastoma gene product inhibits TGF-beta1 induced apoptosis in primary rat hepatocytes and human HuH-7 hepatoma cells. *Oncogene.* 1996 May 2;12(9):1909-19.
- [Fan R, Wu MT, Miller D, Wain JC, Kelsey KT, Wiencke JK, Christiani DC.](#) The p53 codon 72 polymorphism and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000 Oct;9(10):1037-42.
- [Fanidi A, Harrington EA, Evan GI.](#) Cooperative interaction between c-myc and bcl-2 proto-oncogenes. *Nature.* 1992 Oct 8;359(6395):554-6.
- [Farmer G, Bargonetti J, Zhu H, Friedman P, Prywes R, Prives C.](#) Wild-type p53 activates transcription in vitro. *Nature.* 1992 Jul 2;358(6381):83-6.
- [Fearnhead HO, McCurrach ME, O'Neill J, Zhang K, Lowe SW, Lazebnik YA.](#) Oncogene-dependent apoptosis in extracts from drug-resistant cells. *Genes Dev.* 1997 May 15;11(10):1266-76.
- [Fernandez PC, Frank SR, Wang L, Schroeder M, Liu S, Greene J, Cocito A, Amati B.](#) Genomic targets of the human c-Myc protein. *Genes Dev.* 2003 May 1;17(9):1115-29. Epub 2003 Apr 14.
- [Ferrell JE Jr, Wu M, Gerhart JC, Martin GS.](#) Cell cycle tyrosine phosphorylation of p34cdc2 and a microtubule-associated protein kinase homolog in *Xenopus* oocytes and eggs. *Mol Cell Biol.* 1991 Apr;11(4):1965-71.
- [Fields S, Jang SK.](#) Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. *Science.* 1990 Aug 31;249(4972):1046-9.
- [Fong CT, Dracopoli NC, White PS, Merrill PT, Griffith RC, Housman DE, Brodeur GM.](#) Loss of heterozygosity for the short arm of chromosome 1 in human neuroblastomas: correlation with N-myc amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 May;86(10):3753-7.
- [Fraser A, Evan G.](#) A license to kill. *Cell.* 1996 Jun 14;85(6):781-4. Review.
- [Freytag SO, Dang CV, Lee WM.](#) Definition of the activities and properties of c-myc required to inhibit cell differentiation. *Cell Growth Differ.* 1990 Jul;1(7):339-43.
- [Friend SH, Bernards R, Rogelj S, Weinberg RA, Rapaport JM, Albert DM, Dryja TP.](#) A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature.* 1986 Oct 16-22;323(6089):643-6.
- [Galaktionov K, Chen X, Beach D.](#) Cdc25 cell-cycle phosphatase as a target of c-myc. *Nature.* 1996 Aug 8;382(6591):511-7.
- [Galderisi U, Di Bernardo G, Cipollaro M, Peluso G, Cascino A, Cotrufo R, Melone MA.](#) Differentiation and apoptosis of neuroblastoma cells: role of N-myc gene product. *J Cell Biochem.* 1999 Apr 1;73(1):97-105.

[Gali-Muhtasib H, Bakkar N.](#) Modulating cell cycle: current applications and prospects for future drug development. *Curr Cancer Drug Targets*. 2002 Dec;2(4):309-36. Review.

[Geng Y, Eaton EN, Picon M, Roberts JM, Lundberg AS, Gifford A, Sardet C, Weinberg RA.](#) Regulation of cyclin E transcription by E2Fs and retinoblastoma protein. *Oncogene*. 1996 Mar 21;12(6):1173-80.

[Goldstein LJ, Fojo AT, Ueda K, Crist W, Green A, Brodeur G, Pastan I, Gottesman MM.](#) Expression of the multidrug resistance, MDR1, gene in neuroblastomas. *J Clin Oncol*. 1990 Jan;8(1):128-36.

[Golias CH, Charalabopoulos A, Charalabopoulos K.](#) Cell proliferation and cell cycle control: a mini review. *Int J Clin Pract*. 2004 Dec;58(12):1134-41. Review.

[Goruppi S, Gustincich S, Brancolini C, Lee WM, Schneider C.](#) Dissection of c-myc domains involved in S phase induction of NIH3T3 fibroblasts. *Oncogene*. 1994 Jun;9(6):1537-44.

[Grandori C, Cowley SM, James LP, Eisenman RN.](#) The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2000;16:653-99. Review.

[Grant PA, Duggan L, Cote J, Roberts SM, Brownell JE, Candau R, Ohba R, Owen-Hughes T, Allis CD, Winston F, Berger SL, Workman JL.](#) Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex. *Genes Dev*. 1997 Jul 1;11(13):1640-50.

[Grant PA, Schieltz D, Pray-Grant MG, Yates JR 3rd, Workman JL.](#) The ATM-related cofactor Tra1 is a component of the purified SAGA complex. *Mol Cell*. 1998 Dec;2(6):863-7.

[Grant PA, Sterner DE, Duggan LJ, Workman JL, Berger SL.](#) The SAGA unfolds: convergence of transcription regulators in chromatin-modifying complexes. *Trends Cell Biol*. 1998 May;8(5):193-7. Review.

[Greenberg RA, O'Hagan RC, Deng H, Xiao Q, Hann SR, Adams RR, Lichtsteiner S, Chin L, Morin GB, DePinho RA.](#) Telomerase reverse transcriptase gene is a direct target of c-Myc but is not functionally equivalent in cellular transformation. *Oncogene*. 1999 Feb 4;18(5):1219-26.

[Gregory MA, Xiao Q, Cornwall GA, Lutterbach B, Hann SR.](#) B-Myc is preferentially expressed in hormonally-controlled tissues and inhibits cellular proliferation. *Oncogene*. 2000 Oct 5;19(42):4886-95.

[Guan KL, Jenkins CW, Li Y, Nichols MA, Wu X, O'Keefe CL, Matera AG, Xiong Y.](#) Growth suppression by p18, a p16INK4/MTS1- and p14INK4B/MTS2-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function. *Genes Dev*. 1994 Dec 15;8(24):2939-52.

[Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS, Beijersbergen RL, Brooks MW, Weinberg RA.](#) Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature*. 1999 Jul 29;400(6743):464-8.

[Hann SR, Abrams HD, Rohrschneider LR, Eisenman RN.](#) Proteins encoded by v-myc and c-myc oncogenes: identification and localization in acute leukemia virus transformants and bursal lymphoma cell lines. *Cell*. 1983 Oct;34(3):789-98.

- [Hann HW, Evans AE, Siegel SE, Wong KY, Sather H, Dalton A, Hammond D, Seeger RC.](#) Prognostic importance of serum ferritin in patients with Stages III and IV neuroblastoma: the Childrens Cancer Study Group experience. *Cancer Res.* 1985 Jun;45(6):2843-8.
- [Hann SR, Thompson CB, Eisenman RN.](#) c-myc oncogene protein synthesis is independent of the cell cycle in human and avian cells. *Nature.* 1985 Mar 28-Apr 3;314(6009):366-9.
- [Hannon GJ, Beach D.](#) p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature.* 1994 Sep 15;371(6494):257-61.
- [Harbour JW, Dean DC.](#) Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis. *Nat Cell Biol.* 2000 Apr;2(4):E65-7. Review.
- [Harrington EA, Bennett MR, Fanidi A, Evan GI.](#) c-Myc-induced apoptosis in fibroblasts is inhibited by specific cytokines. *EMBO J.* 1994 Jul 15;13(14):3286-95.
- [Hartwell LH, Mortimer RK, Culotti J, Culotti M.](#) Genetic Control of the Cell Division Cycle in Yeast: V. Genetic Analysis of cdc Mutants. *Genetics.* 1973 Jun;74(2):267-286.
- [Haupt Y, Rowan S, Shaulian E, Vousden KH, Oren M.](#) Induction of apoptosis in HeLa cells by trans-activation-deficient p53. *Genes Dev.* 1995 Sep 1;9(17):2170-83.
- [Heikkila R, Schwab G, Wickstrom E, Loke SL, Pluznik DH, Watt R, Neckers LM.](#) A c-myc antisense oligodeoxynucleotide inhibits entry into S phase but not progress from G0 to G1. *Nature.* 1987 Jul 30-Aug 5;328(6129):445-9.
- [Hempstead BL.](#) The many faces of p75NTR. *Curr Opin Neurobiol.* 2002 Jun;12(3):260-7. Review.
- [Henriksson M, Luscher B.](#) Proteins of the Myc network: essential regulators of cell growth and differentiation. *Adv Cancer Res.* 1996;68:109-82. Review.
- [Herbst A, Hemann MT, Tworkowski KA, Salghetti SE, Lowe SW, Tansey WP.](#) A conserved element in Myc that negatively regulates its proapoptotic activity. *EMBO Rep.* 2005 Feb;6(2):177-83.
- [Hermeking H, Eick D.](#) Mediation of c-Myc-induced apoptosis by p53. *Science.* 1994 Sep 30;265(5181):2091-3.
- [Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T, Matsuura Y, Piatyszek MA, Shay JW.](#) Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes. *Nat Med.* 1995 Mar;1(3):249-55.
- [Ho R, Eggert A, Hishiki T, Minturn JE, Ikegaki N, Foster P, Camoratto AM, Evans AE, Brodeur GM.](#) Resistance to chemotherapy mediated by TrkB in neuroblastomas. *Cancer Res.* 2002 Nov 15;62(22):6462-6.
- [Hoang AT, Cohen KJ, Barrett JF, Bergstrom DA, Dang CV.](#) Participation of cyclin A in Myc-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Jul 19;91(15):6875-9.
- [Hsiao KM, McMahon SL, Farnham PJ.](#) Multiple DNA elements are required for the growth regulation of the mouse E2F1 promoter. *Genes Dev.* 1994 Jul 1;8(13):1526-37.

[Hsu B, Marin MC, el-Naggar AK, Stephens LC, Brisbay S, McDonnell TJ.](#) Evidence that c-myc mediated apoptosis does not require wild-type p53 during lymphomagenesis. *Oncogene*. 1995 Jul 6;11(1):175-9.

[Hueber AO, Zornig M, Lyon D, Suda T, Nagata S, Evan GI.](#) Requirement for the CD95 receptor-ligand pathway in c-Myc-induced apoptosis. *Science*. 1997 Nov 14;278(5341):1305-9.

[Hurlin PJ, Queva C, Eisenman RN.](#) Mnt, a novel Max-interacting protein is coexpressed with Myc in proliferating cells and mediates repression at Myc binding sites. *Genes Dev*. 1997 Jan 1;11(1):44-58.

[Hurlin PJ, Zhou ZQ, Toyono-Oka K, Ota S, Walker WL, Hirotsune S, Wynshaw-Boris A.](#) Evidence of mnt-myc antagonism revealed by mnt gene deletion. *Cell Cycle*. 2004 Feb;3(2):97-9. Review.

[Inghirami G, Grignani F, Sternas L, Lombardi L, Knowles DM, Dalla-Favera R.](#) Down-regulation of LFA-1 adhesion receptors by C-myc oncogene in human B lymphoblastoid cells. *Science*. 1990 Nov 2;250(4981):682-6.

[Jacobs JJ, Scheijen B, Voncken JW, Kieboom K, Berns A, van Lohuizen M.](#) Bmi-1 collaborates with c-Myc in tumorigenesis by inhibiting c-Myc-induced apoptosis via INK4a/ARF. *Genes Dev*. 1999 Oct 15;13(20):2678-90.

[Janicke RU, Lee FH, Porter AG.](#) Nuclear c-Myc plays an important role in the cytotoxicity of tumor necrosis factor alpha in tumor cells. *Mol Cell Biol*. 1994 Sep;14(9):5661-70.

[Joyce D, Albanese C, Steer J, Fu M, Bouzahzah B, Pestell RG.](#) NF-kappaB and cell-cycle regulation: the cyclin connection. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2001 Mar;12(1):73-90. Review.

Kaatsch P, Spix C et al., Daten zum Jahresbericht 2006/2007 des Deutschen Krebsregisters, http://info.imsd.uni-mainz.de/K_Krebsregister/ (am 27.08.2008)

[Kang J, Rychahou PG, Ishola TA, Mourot JM, Evers BM, Chung DH.](#) N-myc is a novel regulator of PI3K-mediated VEGF expression in neuroblastoma. *Oncogene*. 2008 Feb 18.

[Kastan MB, Zhan Q, el-Deiry WS, Carrier F, Jacks T, Walsh WV, Plunkett BS, Vogelstein B, Fornace AJ Jr.](#) A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell*. 1992 Nov 13;71(4):587-97.

[Kato GJ, Barrett J, Villa-Garcia M, Dang CV.](#) An amino-terminal c-myc domain required for neoplastic transformation activates transcription. *Mol Cell Biol*. 1990 Nov;10(11):5914-20.

[Kawasaki H, Mukai K, Yajima S, Tanaka R, Takayama J, Takasaki Y, Ohira M.](#) Prognostic value of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunostaining in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol*. 1995 May;24(5):300-4.

[Keim DR, Hailat N, Kuick R, Reynolds CP, Brodeur GM, Seeger RC, Hanash SM.](#) PCNA levels in neuroblastoma are increased in tumors with an amplified N-myc gene and in metastatic stage tumors. *Clin Exp Metastasis*. 1993 Jan;11(1):83-90.

[Keshelava N, Seeger RC, Reynolds CP.](#) Drug resistance in human neuroblastoma cell lines correlates with clinical therapy. *Eur J Cancer*. 1997 Oct;33(12):2002-6.

[Kim YH, Buchholz MA, Chrest FJ, Nordin AA.](#) Up-regulation of c-myc induces the gene expression of the murine homologues of p34cdc2 and cyclin-dependent kinase-2 in T lymphocytes. *J Immunol.* 1994 May 1;152(9):4328-35.

[Kleefstrom J, Arighi E, Littlewood T, Jaattela M, Saksela E, Evan GI, Alitalo K.](#) Induction of TNF-sensitive cellular phenotype by c-Myc involves p53 and impaired NF-kappaB activation. *EMBO J.* 1997 Dec 15;16(24):7382-92.

[Knoepfler PS, Zhang XY, Cheng PF, Gafken PR, McMahon SB, Eisenman RN.](#) Myc influences global chromatin structure. *EMBO J.* 2006 Jun 21;25(12):2723-34. Epub 2006 May 25.

[Knudson AG Jr, Strong LC.](#) Mutation and cancer: neuroblastoma and pheochromocytoma. *Am J Hum Genet.* 1972 Sep;24(5):514-32.

[Koff A, Giordano A, Desai D, Yamashita K, Harper JW, Elledge S, Nishimoto T, Morgan DO, Franza BR, Roberts JM.](#) Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. *Science.* 1992 Sep 18;257(5077):1689-94.

[Kogner P, Barbany G, Dominici C, Castello MA, Raschella G, Persson H.](#) Coexpression of messenger RNA for TRK protooncogene and low affinity nerve growth factor receptor in neuroblastoma with favorable prognosis. *Cancer Res.* 1993 May 1;53(9):2044-50.

Koletzko – Kinderheilkunde und Jugendmedizin, 12. Auflage, Springer Verlag 2003

[Kretzner L, Blackwood EM, Eisenman RN.](#) Myc and Max proteins possess distinct transcriptional activities. *Nature.* 1992 Oct 1;359(6394):426-9.

[Kuroda H, Sugimoto T, Ueda K, Tsuchida S, Horii Y, Inazawa J, Sato K, Sawada T.](#) Different drug sensitivity in two neuroblastoma cell lines established from the same patient before and after chemotherapy. *Int J Cancer.* 1991 Mar 12;47(5):732-7.

[Kushner BH, Helson L.](#) Monozygotic siblings discordant for neuroblastoma: etiologic implications. *J Pediatr.* 1985 Sep;107(3):405-9.

[Ladisch S, Wu ZL.](#) Detection of a tumour-associated ganglioside in plasma of patients with neuroblastoma. *Lancet.* 1985 Jan 19;1(8421):136-8.

[Land H, Parada LF, Weinberg RA.](#) Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature.* 1983 Aug 18-24;304(5927):596-602.

[Lee EY, To H, Shew JY, Bookstein R, Scully P, Lee WH.](#) Inactivation of the retinoblastoma susceptibility gene in human breast cancers. *Science.* 1988 Jul 8;241(4862):218-21.

[Lemaitre JM, Buckle RS, Mechali M.](#) c-Myc in the control of cell proliferation and embryonic development. *Adv Cancer Res.* 1996;70:95-144. Review.

[Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J.](#) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell.* 1998 Aug 21;94(4):491-501.

[Li LH, Nerlov C, Prendergast G, MacGregor D, Ziff EB.](#) c-Myc represses transcription in vivo by a novel mechanism dependent on the initiator element and Myc box II. *EMBO J.* 1994 Sep 1;13(17):4070-9.

[Liu X, Tesfai J, Evrard YA, Dent SY, Martinez E.](#) c-Myc transformation domain recruits the human STAGA complex and requires TRRAP and GCN5 acetylase activity for transcription activation. *J Biol Chem.* 2003 May 30;278(22):20405-12. Epub 2003 Mar 26.

[Lopez-Saez JF, de la Torre C, Pincheira J, Gimenez-Martin G.](#) Cell proliferation and cancer. *Histol Histopathol.* 1998 Oct;13(4):1197-214. Review.

[Lukas J, Parry D, Aagaard L, Mann DJ, Bartkova J, Strauss M, Peters G, Bartek J.](#) Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16. *Nature.* 1995 Jun 8;375(6531):503-6.

[Luo Y, Hurwitz J, Massague J.](#) Cell-cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in p21Cip1. *Nature.* 1995 May 11;375(6527):159-61.

[Lutz W, Stohr M, Schurmann J, Wenzel A, Lohr A, Schwab M.](#) Conditional expression of N-myc in human neuroblastoma cells increases expression of alpha-prothymosin and ornithine decarboxylase and accelerates progression into S-phase early after mitogenic stimulation of quiescent cells. *Oncogene.* 1996 Aug 15;13(4):803-12.

[Malumbres M, Carnero A.](#) Cell cycle deregulation: a common motif in cancer. *Prog Cell Cycle Res.* 2003;5:5-18. Review.

[Marcu KB, Bossone SA, Patel AJ.](#) myc function and regulation. *Annu Rev Biochem.* 1992;61:809-60. Review.

[Maris JM, Matthay KK.](#) Molecular biology of neuroblastoma. *J Clin Oncol.* 1999 Jul;17(7):2264-79. Review.

[Maris JM, Weiss MJ, Mosse Y, Hii G, Guo C, White PS, Hogarty MD, Mirensky T, Brodeur GM, Rebbeck TR, Urbanek M, Shusterman S.](#) Evidence for a hereditary neuroblastoma predisposition locus at chromosome 16p12-13. *Cancer Res.* 2002 Nov 15;62(22):6651-8.

[Martinou JC.](#) Apoptosis. Key to the mitochondrial gate. *Nature.* 1999 Jun 3;399(6735):411-2.

[Mateyak MK, Obaya AJ, Adachi S, Sedivy JM.](#) Phenotypes of c-Myc-deficient rat fibroblasts isolated by targeted homologous recombination. *Cell Growth Differ.* 1997 Oct;8(10):1039-48.

[Matsumoto K, Wada RK, Yamashiro JM, Kaplan DR, Thiele CJ.](#) Expression of brain-derived neurotrophic factor and p145TrkB affects survival, differentiation, and invasiveness of human neuroblastoma cells. *Cancer Res.* 1995 Apr 15;55(8):1798-806.

[McDonald ER 3rd, El-Deiry WS.](#) Checkpoint genes in cancer. *Ann Med.* 2001 Mar;33(2):113-22. Review.

[McMahon SB, Van Buskirk HA, Dugan KA, Copeland TD, Cole MD.](#) The novel ATM-related protein TRRAP is an essential cofactor for the c-Myc and E2F oncoproteins. *Cell.* 1998 Aug 7;94(3):363-74.

[Meroni G, Reymond A, Alcalay M, Borsani G, Tanigami A, Tonlorenzi R, Nigro CL, Messali S, Zollo M, Ledbetter DH, Brent R, Ballabio A, Carozzo R.](#) Rox, a novel bHLHZip protein expressed in quiescent cells that heterodimerizes with Max, binds a non-canonical E box and acts as a transcriptional repressor. *EMBO J.* 1997 May 15;16(10):2892-906. Erratum in: *EMBO J* 1997 Oct 1;16(19):6055.

- [Mink S, Mutschler B, Weiskirchen R, Bister K, Klempnauer KH.](#) A novel function for Myc: inhibition of C/EBP-dependent gene activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Jun 25;93(13):6635-40.
- [Mitchell KO, Ricci MS, Miyashita T, Dicker DT, Jin Z, Reed JC, El-Deiry WS.](#) Bax is a transcriptional target and mediator of c-myc-induced apoptosis. *Cancer Res.* 2000 Nov 15;60(22):6318-25.
- [Morgan DO.](#) Principles of CDK regulation. *Nature.* 1995 Mar 9;374(6518):131-4. Review.
- [Moroni MC, Hickman ES, Lazzerini Denchi E, Caprara G, Colli E, Cecconi F, Muller H, Helin K.](#) Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53. *Nat Cell Biol.* 2001 Jun;3(6):552-8.
- [Moshier JA, Dosescu J, Skunca M, Luk GD.](#) Transformation of NIH/3T3 cells by ornithine decarboxylase overexpression. *Cancer Res.* 1993 Jun 1;53(11):2618-22.
- [Mukherjee B, Morgenbesser SD, DePinho RA.](#) Myc family oncoproteins function through a common pathway to transform normal cells in culture: cross-interference by Max and trans-acting dominant mutants. *Genes Dev.* 1992 Aug;6(8):1480-92.
- [Muller D, Bouchard C, Rudolph B, Steiner P, Stuckmann I, Saffrich R, Ansorge W, Huttner W, Eilers M.](#) Cdk2-dependent phosphorylation of p27 facilitates its Myc-induced release from cyclin E/cdk2 complexes. *Oncogene.* 1997 Nov 20;15(21):2561-76.
- [Nakagawara A, Arima-Nakagawara M, Scavarda NJ, Azar CG, Cantor AB, Brodeur GM.](#) Association between high levels of expression of the TRK gene and favorable outcome in human neuroblastoma. *N Engl J Med.* 1993 Mar 25;328(12):847-54.
- [Nakagawara A, Azar CG, Scavarda NJ, Brodeur GM.](#) Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas. *Mol Cell Biol.* 1994 Jan;14(1):759-67.
- [Nakagawara A, Brodeur GM.](#) Role of neurotrophins and their receptors in human neuroblastomas: a primary culture study. *Eur J Cancer.* 1997 Oct;33(12):2050-3.
- [Nakamura K, Martin KC, Jackson JK, Beppu K, Woo CW, Thiele CJ.](#) Brain-derived neurotrophic factor activation of TrkB induces vascular endothelial growth factor expression via hypoxia-inducible factor-1alpha in neuroblastoma cells. *Cancer Res.* 2006 Apr 15;66(8):4249-55.
- “NB2004 Trial Protocol for Risk Adapted Treatment of Children with Neuroblastoma”, der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie, Version: 1.00 from 01-Sept-2004
- [Nesbit CE, Tersak JM, Prochownik EV.](#) MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene.* 1999 May 13;18(19):3004-16. Review.
- [Nikiforov MA, Chandriani S, Park J, Kotenko I, Matheos D, Johnsson A, McMahon SB, Cole MD.](#) TRRAP-dependent and TRRAP-independent transcriptional activation by Myc family oncoproteins. *Mol Cell Biol.* 2002 Jul;22(14):5054-63.

- [Nikiforov MA, Kotenko I, Petrenko O, Beavis A, Valenick L, Lemischka I, Cole MD.](#) Complementation of Myc-dependent cell proliferation by cDNA expression library screening. *Oncogene*. 2000 Oct 5;19(42):4828-31.
- [Nilsson JA, Maclean KH, Keller UB, Pendeville H, Baudino TA, Cleveland JL.](#) Mnt loss triggers Myc transcription targets, proliferation, apoptosis, and transformation. *Mol Cell Biol*. 2004 Feb;24(4):1560-9.
- [Norris MD, Bordow SB, Marshall GM, Haber PS, Cohn SL, Haber M.](#) Expression of the gene for multidrug-resistance-associated protein and outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med*. 1996 Jan 25;334(4):231-8.
- [Ohtani K, DeGregori J, Nevins JR.](#) Regulation of the cyclin E gene by transcription factor E2F1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Dec 19;92(26):12146-50.
- [Ohtsubo M, Theodoras AM, Schumacher J, Roberts JM, Pagano M.](#) Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol Cell Biol*. 1995 May;15(5):2612-24.
- [Orian A, van Steensel B, Delrow J, Bussemaker HJ, Li L, Sawado T, Williams E, Loo LW, Cowley SM, Yost C, Pierce S, Edgar BA, Parkhurst SM, Eisenman RN.](#) Genomic binding by the Drosophila Myc, Max, Mad/Mnt transcription factor network. *Genes Dev*. 2003 May 1;17(9):1101-14. Epub 2003 Apr 14.
- [Oster SK, Mao DY, Kennedy J, Penn LZ.](#) Functional analysis of the N-terminal domain of the Myc oncoprotein. *Oncogene*. 2003 Apr 3;22(13):1998-2010.
- [Packham G, Cleveland JL.](#) Ornithine decarboxylase is a mediator of c-Myc-induced apoptosis. *Mol Cell Biol*. 1994 Sep;14(9):5741-7.
- [Packham G, Cleveland JL.](#) The role of ornithine decarboxylase in c-Myc-induced apoptosis. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1995;194:283-90.
- [Pardee AB.](#) A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1974 Apr;71(4):1286-90.
- [Park J, Kunjibettu S, McMahon SB, Cole MD.](#) The ATM-related domain of TRRAP is required for histone acetyltransferase recruitment and Myc-dependent oncogenesis. *Genes Dev*. 2001 Jul 1;15(13):1619-24.
- [Parker SB, Eichele G, Zhang P, Rawls A, Sands AT, Bradley A, Olson EN, Harper JW, Elledge SJ.](#) p53-independent expression of p21Cip1 in muscle and other terminally differentiating cells. *Science*. 1995 Feb 17;267(5200):1024-7.
- [Patapoutian A, Reichardt LF.](#) Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr Opin Neurobiol*. 2001 Jun;11(3):272-80. Review.
- [Patel JH, Loboda AP, Showe MK, Showe LC, McMahon SB.](#) Analysis of genomic targets reveals complex functions of MYC. *Nat Rev Cancer*. 2004 Jul;4(7):562-8. Review.
- [Pearson BE, Nasheuer HP, Wang TS.](#) Human DNA polymerase alpha gene: sequences controlling expression in cycling and serum-stimulated cells. *Mol Cell Biol*. 1991 Apr;11(4):2081-95.

[Perez-Roger I, Solomon DL, Sewing A, Land H.](#) Myc activation of cyclin E/Cdk2 kinase involves induction of cyclin E gene transcription and inhibition of p27(Kip1) binding to newly formed complexes. *Oncogene*. 1997 May 22;14(20):2373-81.

[Peter M, Herskowitz I.](#) Joining the complex: cyclin-dependent kinase inhibitory proteins and the cell cycle. *Cell*. 1994 Oct 21;79(2):181-4. Review.

[Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, Sherr CJ, Massague J, Roberts JM, Koff A.](#) p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev*. 1994 Jan;8(1):9-22.

[Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liegeois NJ, Silverman A, Alland L, Chin L, Potes J, Chen K, Orlow I, Lee HW, Cordon-Cardo C, DePinho RA.](#) The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell*. 1998 Mar 20;92(6):713-23.

[Prendergast GC, Cole MD.](#) Posttranscriptional regulation of cellular gene expression by the c-myc oncogene. *Mol Cell Biol*. 1989 Jan;9(1):124-34.

[Prendergast GC, Lawe D, Ziff EB.](#) Association of Myn, the murine homolog of max, with c-Myc stimulates methylation-sensitive DNA binding and ras cotransformation. *Cell*. 1991 May 3;65(3):395-407.

[Prochownik EV, Kukowska J, Rodgers C.](#) c-myc antisense transcripts accelerate differentiation and inhibit G1 progression in murine erythroleukemia cells. *Mol Cell Biol*. 1988 Sep;8(9):3683-95.

[Pucci B, Kasten M, Giordano A.](#) Cell cycle and apoptosis. *Neoplasia*. 2000 Jul-Aug;2(4):291-9. Review.

[Qi Y, Gregory MA, Li Z, Brousal JP, West K, Hann SR.](#) p19ARF directly and differentially controls the functions of c-Myc independently of p53. *Nature*. 2004 Oct 7;431(7009):712-7. Epub 2004 Sep 8.

[Raff M.](#) Cell suicide for beginners. *Nature*. 1998 Nov 12;396(6707):119-22.

[Reisman D, Elkind NB, Roy B, Beamon J, Rotter V.](#) c-Myc trans-activates the p53 promoter through a required downstream CACGTG motif. *Cell Growth Differ*. 1993 Feb;4(2):57-65.

[Resar LM, Dolde C, Barrett JF, Dang CV.](#) B-myc inhibits neoplastic transformation and transcriptional activation by c-myc. *Mol Cell Biol*. 1993 Feb;13(2):1130-6.

[Robbins BA, de la Vega D, Ogata K, Tan EM, Nakamura RM.](#) Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in solid human malignancies. *Arch Pathol Lab Med*. 1987 Sep;111(9):841-5.

[Roberts JM, Koff A, Polyak K, Firpo E, Collins S, Ohtsubo M, Massague J.](#) Cyclins, Cdks, and cyclin kinase inhibitors. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1994;59:31-8. Review.

[Roussel MF, Theodoras AM, Pagano M, Sherr CJ.](#) Rescue of defective mitogenic signaling by D-type cyclins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Jul 18;92(15):6837-41.

[Roussel M, Saule S, Lagrou C, Rommens C, Beug H, Graf T, Stehelin D.](#) Three new types of viral oncogene of cellular origin specific for haematopoietic cell transformation. *Nature*. 1979 Oct 11;281(5731):452-5.

[Rudolph B, Saffrich R, Zwicker J, Henglein B, Muller R, Ansorge W, Eilers M.](#) Activation of cyclin-dependent kinases by Myc mediates induction of cyclin A, but not apoptosis. *EMBO J*. 1996 Jun 17;15(12):3065-76.

[Ruley HE.](#) Transforming collaborations between ras and nuclear oncogenes. *Cancer Cells*. 1990 Aug-Sep;2(8-9):258-68. Review.

[Sakamuro D, Eviner V, Elliott KJ, Showe L, White E, Prendergast GC.](#) c-Myc induces apoptosis in epithelial cells by both p53-dependent and p53-independent mechanisms. *Oncogene*. 1995 Dec 7;11(11):2411-8.

[Sala A, Nicolaides NC, Engelhard A, Bellon T, Lawe DC, Arnold A, Grana X, Giordano A, Calabretta B.](#) Correlation between E2F-1 requirement in the S phase and E2F-1 transactivation of cell cycle-related genes in human cells. *Cancer Res*. 1994 Mar 15;54(6):1402-6.

[Saleh A, Schieltz D, Ting N, McMahon SB, Litchfield DW, Yates JR 3rd, Lees-Miller SP, Cole MD, Brandl CJ.](#) Tralp is a component of the yeast Ada.Spt transcriptional regulatory complexes. *J Biol Chem*. 1998 Oct 9;273(41):26559-65.

[Schulze A, Zerfass K, Spitkovsky D, Middendorp S, Berges J, Helin K, Jansen-Durr P, Henglein B.](#) Cell cycle regulation of the cyclin A gene promoter is mediated by a variant E2F site. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Nov 21;92(24):11264-8.

[Schwab M, Alitalo K, Klempnauer KH, Varmus HE, Bishop JM, Gilbert F, Brodeur G, Goldstein M, Trent J.](#) Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. *Nature*. 1983 Sep 15-21;305(5931):245-8.

[Schwab M, Varmus HE, Bishop JM.](#) Human N-myc gene contributes to neoplastic transformation of mammalian cells in culture. *Nature*. 1985 Jul 11-17;316(6024):160-2.

[Sears R, Ohtani K, Nevins JR.](#) Identification of positively and negatively acting elements regulating expression of the E2F2 gene in response to cell growth signals. *Mol Cell Biol*. 1997 Sep;17(9):5227-35.

[Seeger RC, Brodeur GM, Sather H, Dalton A, Siegel SE, Wong KY, Hammond D.](#) Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N Engl J Med*. 1985 Oct 31;313(18):1111-6.

[Serrano M, Hannon GJ, Beach D.](#) A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*. 1993 Dec 16;366(6456):704-7.

[Sherr CJ.](#) Mammalian G1 cyclins. *Cell*. 1993 Jun 18;73(6):1059-65. Review.

[Sherr CJ.](#) Tumor surveillance via the ARF-p53 pathway. *Genes Dev*. 1998 Oct 1;12(19):2984-91. Review.

[Sherr CJ, Roberts JM.](#) Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev*. 1995 May 15;9(10):1149-63. Review.

[Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata J, Joshi VV, Roald B, Stram DO, Gerbing RB, Lukens JN, Matthay KK, Castleberry RP.](#) The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). *Cancer*. 1999 Jul 15;86(2):364-72.

[Shimada H, Chatten J, Newton WA Jr, Sachs N, Hamoudi AB, Chiba T, Marsden HB, Misugi K.](#) Histopathologic prognostic factors in neuroblastic tumors: definition of subtypes of ganglioneuroblastoma and an age-linked classification of neuroblastomas. *J Natl Cancer Inst*. 1984 Aug;73(2):405-16.

[Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y.](#) Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature*. 1999 Jun 3;399(6735):483-7. Erratum in: *Nature* 2000 Oct 12;407(6805):767.

[Shuster JJ, McWilliams NB, Castleberry R, Nitschke R, Smith EI, Altshuler G, Kun L, Brodeur G, Joshi V, Vietti T, et al.](#) Serum lactate dehydrogenase in childhood neuroblastoma. A Pediatric Oncology Group recursive partitioning study. *Am J Clin Oncol*. 1992 Aug;15(4):295-303.

[Sidell N, Altman A, Haussler MR, Seeger RC.](#) Effects of retinoic acid (RA) on the growth and phenotypic expression of several human neuroblastoma cell lines. *Exp Cell Res*. 1983 Oct;148(1):21-30.

[Sommer A, Bousset K, Kremmer E, Austen M, Luscher B.](#) Identification and characterization of specific DNA-binding complexes containing members of the Myc/Max/Mad network of transcriptional regulators. *J Biol Chem*. 1998 Mar 20;273(12):6632-42.

[Soucie EL, Annis MG, Sedivy J, Filmus J, Leber B, Andrews DW, Penn LZ.](#) Myc potentiates apoptosis by stimulating Bax activity at the mitochondria. *Mol Cell Biol*. 2001 Jul;21(14):4725-36.

[Spencer CA, Groudine M.](#) Control of c-myc regulation in normal and neoplastic cells. *Adv Cancer Res*. 1991;56:1-48. Review.

[Staller P, Peukert K, Kiermaier A, Seoane J, Lukas J, Karsunky H, Moroy T, Bartek J, Massague J, Hanel F, Eilers M.](#) Repression of p15INK4b expression by Myc through association with Miz-1. *Nat Cell Biol*. 2001 Apr;3(4):392-9.

[Steiner P, Philipp A, Lukas J, Godden-Kent D, Pagano M, Mittnacht S, Bartek J, Eilers M.](#) Identification of a Myc-dependent step during the formation of active G1 cyclin-cdk complexes. *EMBO J*. 1995 Oct 2;14(19):4814-26.

[Stone J, de Lange T, Ramsay G, Jakobovits E, Bishop JM, Varmus H, Lee W.](#) Definition of regions in human c-myc that are involved in transformation and nuclear localization. *Mol Cell Biol*. 1987 May;7(5):1697-709.

[Strahl BD, Allis CD.](#) The language of covalent histone modifications. *Nature*. 2000 Jan 6;403(6765):41-5.

[Sturzbecher HW, Brain R, Addison C, Rudge K, Remm M, Grimaldi M, Keenan E, Jenkins JR.](#) A C-terminal alpha-helix plus basic region motif is the major structural determinant of p53 tetramerization. *Oncogene*. 1992 Aug;7(8):1513-23.

[Thiele CJ, Reynolds CP, Israel MA.](#) Decreased expression of N-myc precedes retinoic acid-induced morphological differentiation of human neuroblastoma. *Nature*. 1985 Jan 31-Feb 6;313(6001):404-6.

- [Thompson EB](#). The many roles of c-Myc in apoptosis. *Annu Rev Physiol*. 1998;60:575-600. Review.
- [Toyo-oka K, Hirotsune S, Gambello MJ, Zhou ZQ, Olson L, Rosenfeld MG, Eisenman R, Hurlin P, Wynshaw-Boris A](#). Loss of the Max-interacting protein Mnt in mice results in decreased viability, defective embryonic growth and craniofacial defects: relevance to Miller-Dieker syndrome. *Hum Mol Genet*. 2004 May 15;13(10):1057-67. Epub 2004 Mar 17.
- [Ueda K, Ganem D](#). Apoptosis is induced by N-myc expression in hepatocytes, a frequent event in hepadnavirus oncogenesis, and is blocked by insulin-like growth factor II. *J Virol*. 1996 Mar;70(3):1375-83.
- [Vassilev A, Yamauchi J, Kotani T, Prives C, Avantiaggiati ML, Qin J, Nakatani Y](#). The 400 kDa subunit of the PCAF histone acetylase complex belongs to the ATM superfamily. *Mol Cell*. 1998 Dec;2(6):869-75.
- [Vermeulen K, Berneman ZN, Van Bockstaele DR](#). Cell cycle and apoptosis. *Cell Prolif*. 2003 Jun;36(3):165-75. Review.
- [Vernell R, Helin K, Muller H](#). Identification of target genes of the p16INK4A-pRB-E2F pathway. *J Biol Chem*. 2003 Nov 14;278(46):46124-37. Epub 2003 Aug 15.
- [Vigo E, Muller H, Prosperini E, Hateboer G, Cartwright P, Moroni MC, Helin K](#). CDC25A phosphatase is a target of E2F and is required for efficient E2F-induced S phase. *Mol Cell Biol*. 1999 Sep;19(9):6379-95.
- [Vlach J, Hennecke S, Alevizopoulos K, Conti D, Amati B](#). Growth arrest by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is abrogated by c-Myc. *EMBO J*. 1996 Dec 2;15(23):6595-604.
- [Wang J, Xie LY, Allan S, Beach D, Hannon GJ](#). Myc activates telomerase. *Genes Dev*. 1998 Jun 15;12(12):1769-74.
- [Weber JD, Taylor LJ, Roussel MF, Sherr CJ, Bar-Sagi D](#). Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nat Cell Biol*. 1999 May;1(1):20-6.
- [Weinberg RA](#). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*. 1995 May 5;81(3):323-30. Review.
- [White PS, Thompson PM, Seifried BA, Sulman EP, Jensen SJ, Guo C, Maris JM, Hogarty MD, Allen C, Biegel JA, Matisse TC, Gregory SG, Reynolds CP, Brodeur GM](#). Detailed molecular analysis of 1p36 in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol*. 2001 Jan;36(1):37-41.
- [Winston JT, Pledger WJ](#). Growth factor regulation of cyclin D1 mRNA expression through protein synthesis-dependent and -independent mechanisms. *Mol Biol Cell*. 1993 Nov;4(11):1133-44.
- [Woo M, Hakem R, Soengas MS, Duncan GS, Shahinian A, Kagi D, Hakem A, McCurrach M, Khoo W, Kaufman SA, Senaldi G, Howard T, Lowe SW, Mak TW](#). Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. *Genes Dev*. 1998 Mar 15;12(6):806-19.
- [Wyllie AH](#). Apoptosis (the 1992 Frank Rose Memorial Lecture). *Br J Cancer*. 1993 Feb;67(2):205-8. Review.

- [Xiao Q, Claassen G, Shi J, Adachi S, Sedivy J, Hann SR.](#) Transactivation-defective c-MycS retains the ability to regulate proliferation and apoptosis. *Genes Dev.* 1998 Dec 15;12(24):3803-8.
- [Yam CH, Fung TK, Poon RY.](#) Cyclin A in cell cycle control and cancer. *Cell Mol Life Sci.* 2002 Aug;59(8):1317-26. Review.
- [Yamashiro DJ, Nakagawara A, Ikegaki N, Liu XG, Brodeur GM.](#) Expression of TrkC in favorable human neuroblastomas. *Oncogene.* 1996 Jan 4;12(1):37-41.
- [Yancopoulos GD, Nisen PD, Tesfaye A, Kohl NE, Goldfarb MP, Alt FW.](#) N-myc can cooperate with ras to transform normal cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985 Aug;82(16):5455-9.
- [Yano H, Chao MV.](#) Neurotrophin receptor structure and interactions. *Pharm Acta Helv.* 2000 Mar;74(2-3):253-60. Review.
- [Yokoyama K, Imamoto F.](#) Transcriptional control of the endogenous MYC protooncogene by antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 Nov;84(21):7363-7.
- [Yonish-Rouach E, Choisy C, Deguin V, Breugnot C, May E.](#) The role of p53 as a transcription factor in the induction of apoptosis. *Behring Inst Mitt.* 1996 Oct;(97):60-71. Review.
- [Zeltzer PM, Marangos PJ, Evans AE, Schneider SL.](#) Serum neuron-specific enolase in children with neuroblastoma. Relationship to stage and disease course. *Cancer.* 1986 Mar 15;57(6):1230-4.
- [Zindy F, Eischen CM, Randle DH, Kamijo T, Cleveland JL, Sherr CJ, Roussel MF.](#) Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev.* 1998 Aug 1;12(15):2424-33.
- [Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X.](#) Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell.* 1997 Aug 8;90(3):405-13.

Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

Tab. 1:	Klinische Stadieneinteilung des Neuroblastoms
Abb. 1:	Stadienverteilung
Abb. 2:	Stadienverteilung in Abhängigkeit der N-Myc-Amplifikation
Abb. 3:	Kaplan-Meier-Analyse gruppiert nach N-Myc-Amplifikation
Abb. 4:	Repräsentative Banden eines Western Blots für Cyklin A
Abb. 5:	Proliferationsraten
Abb. 6:	Proliferationsraten in Abhängigkeit der N-Myc-Amplifikation
Abb. 7:	Proliferationsraten in Abhängigkeit des Überlebens
Abb. 8:	Kaplan-Meier-Analyse gruppiert nach Proliferationsraten
Abb. 9:	Kaplan-Meier-Analyse gruppiert nach Proliferationsraten -/+ vs. ++
Abb. 10:	Kaplan-Meier-Analyse gruppiert nach Proliferationsraten - vs. +/++
Abb. 11:	Kaplan-Meier-Analyse gruppiert nach Proliferationsraten -/++ vs. +
Abb. 12:	Überlebensrate in Prozent in Abhängigkeit der N-Myc-Amplifikation und der Proliferationsrate
Abb. 13:	Repräsentative Bilder der TUNEL-Färbungen und den dazugehörigen DAPI-gefärbten Arealen
Abb. 14:	Apoptoseraten
Abb. 15:	Apoptoseraten in Abhängigkeit der N-Myc-Amplifikation
Abb. 16:	Apoptoseraten in Abhängigkeit des Überlebens
Abb. 17:	Kaplan-Meier-Analyse gruppiert nach Apoptoseraten
Abb. 18:	Kaplan-Meier-Analyse gruppiert nach Apoptoseraten -/+ vs. ++
Abb. 19:	Kaplan-Meier-Analyse gruppiert nach Apoptoserate - vs. +/++
Abb. 20:	Kaplan-Meier-Analyse gruppiert nach Apoptoserate -/++ vs. +
Abb. 21:	Überlebensrate in Abhängigkeit der N-Myc-Amplifikation und der Apoptoserate
Abb. 22:	Hypothetisches Modell zum prognostischen Einfluss der verschiedenen Proliferations- bzw. Apoptoseraten

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer an der Universität Marburg waren die folgenden Damen und Herren:

Adamkiewicz, Aumüller, Barth, Basler, Baum, Bette, Boudriot, Burbelko, Christiansen, Eilers, Feuser, Gerdes, Giese, Grundmann, Grzeschik, Gudermann, Hertl, Hilt, Höffken, Jackowski-Dohrmann, Jungclas, Kill, Klenk, Klose, Koolmann, Krieg, Kroll, Lang, Lill, Mandrek, Moll, Mueller, Mutters, Oertel, Remschmidt, Renz, Richter, Schäfer, Schmidt, Schnabel, Schrader, Schunk, Seitz, Voigt, Wagner, Walthers, Weihe, Werner, Westermann, Wolf, Wulf

Danksagung

Mein Dank dafür, dass ich die vorliegende Arbeit habe anfertigen können, gilt:

Herrn Professor Dr. med. Holger Christiansen, meinem Doktorvater, für die Bereitstellung des interessanten Themas, die Möglichkeit zur Durchführung der Arbeit in seinem Labor, sowie für die vielen anregenden und für mich äußerst lehrreichen Gespräche.

Herrn Professor Dr. med. Rolf Maier, für die Möglichkeit zur Durchführung der Arbeit im Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin der Philipps-Universität Marburg.

Herrn Dr. med. Eckhard Bergmann für seine stets freundschaftliche Unterstützung bei den verwendeten Methoden, seine konstruktive Kritik und Beratung und schließlich für seinen maßgeblichen Beitrag zur angenehmen Laboratmosphäre.

Meinen Mitdoktoranden Johanna Dietl, Heiko Held, Judith Verbeek und Anja Schmidt.
Geteiltes Leid ist halbes Leid!

Unseren medizinisch-technischen Assistentinnen Monika und Martina für ihre Hilfsbereitschaft und die vielen gemeinsam genossenen Kaffees!

Meinen Freunden (insb. Matthias für die Bereitstellung seines Internetzuganges!) und meiner Freundin Kirsten für die moralische Unterstützung und die nötige Ablenkung wann immer ich sie brauchte!

Schließlich gilt mein ganz besonderer Dank meiner Familie: diese Arbeit ist für –und vor allem– wegen euch!